UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANDREA VANIA CONSTANTINO

QUANTIFICAÇÃO DE UREIA E CREATININA EM SORO SANGUÍNEO DE CÃES E GATOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, agosto/2026

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANDREA VANIA CONSTANTINO

QUANTIFICAÇÃO DE UREIA E CREATININA EM SORO SANGUÍNEO DE CÃES E GATOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Coorientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, agosto/2026

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANDREA VANIA CONSTANTINO

QUANTIFICAÇÃO DE UREIA E CREATININA EM SORO SANGUÍNEO DE CÃES E GATOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Orientador
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.
Membro interno
Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Lívia Helena Moreira da Silva Melo
Membro interno
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Jessé Marques da Silva Junior Pavão
Membro externo
Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro
Coordenador
Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, agosto/2026

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

ANDREA VANIA CONSTANTINO

Bióloga graduada pela Universidade Nove de Julho em 2009; Médica Veterinária graduada pela Universidade Anhembi Morumbi em 2019; Especialista em Clínica Médica de pequenos animais pela Faculdade Metropolitana; Especialista em Dermatologia em pequenos animais pela Faculdade Qualittas.

M26q Marangoni, Andrea Vania Constantino
Qualificação da ureia e creatina em soro sanguíneo de cães e gatos portadores de doença renal utilizando a Espectroscopia Raman / Andrea Vania Constantino Marangoni; Landulfo Silveira Junior - 2026.
81; 30 cm.

Orientador (a): Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo - 2026.
Bibliografia: f. 73 - 79

1. Doença Renal 2. Soro sanguíneo 3. Cães e gatos 4. Diagnóstico 5. Espectroscopia Raman visual I. Marangoni, Andrea Vania Constantino II. Título

CDD 620.1

Biblioteca Universidade Anhembi Morumbi

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas filhas, Isabella e Maria Julia, e à minha neta, Maria Manoela, por serem minha maior razão para nunca desistir e por me fazerem acreditar que, na vida, nada é por acaso; que os momentos difíceis não são eternos e que viver vale muito a pena.

Dedico também ao meu tio Renato, aos meus irmãos, Adriano e Alexssander, sobrinhos e cunhadas, que estiveram ao meu lado, oferecendo apoio, carinho e incentivo em todos os momentos. E, é claro, às minhas fiéis amigas, que nunca soltaram a minha mão.

Ao meu pai, Adriano, à minha vovó Glória e ao meu vovô Giuseppe, *in memoriam*, minha eterna gratidão e saudade.

À minha mãe, Rita Vania, representação de força e doçura, meu maior exemplo de amor e coragem. Eu sou Andrea porque ela é a minha Rita.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco pela sua orientação e ensinamentos e ao Professor Dr. Landulfo Silveira Jr. por toda a ajuda e paciência ao longo desta trajetória.

RESUMO

As alterações da função renal representam uma das maiores casuísticas na clínica de pequenos animais. Entre as principais formas de disfunção renal, destacam-se a doença renal crônica (DRC) e a insuficiência renal aguda (IRA). O diagnóstico precoce é essencial para o prognóstico e baseia-se na análise de biomarcadores como ureia e creatinina, e a espectroscopia Raman surge como técnica promissora de diagnóstico. Este estudo teve como objetivo utilizar a espectroscopia Raman para avaliar os níveis de ureia e creatinina em amostras de soro de cães e gatos com e sem disfunção renal. Foram obtidas 89 amostras de soro sanguíneo de cães e gatos com e sem alterações renais e os espectros Raman, coletados a partir destas amostras, foram avaliados por meio de métodos multivariados, incluindo a análise de componentes principais (PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), empregadas para identificar diferenças bioquímicas nas amostras de soro e correlacionar os dados espectrais com os valores bioquímicos obtidos por técnica de referência. A diferença nos espectros dos soros dos animais com e sem alteração renal e a PCA evidenciaram diferenças no perfil espectral entre os grupos, onde picos associados a proteínas e ureia (principalmente) foram significativamente maiores no soro do grupo com alteração, principalmente nos gatos. A regressão PLS permitiu estimar a concentração de ureia e creatinina, com coeficientes de correlação r = 0,94 e r = 0,89, respectivamente, para gatos, e r = 0,98 e r = 0,93, respectivamente, para cães. A classificação dos espectros no modelo de regressão PLS de acordo com a presença ou não de alteração renal em ambas as espécies e a classificação da espécie de origem do soro resultou em acurácias entre 93% e 95%. A técnica Raman permitiu identificar picos de metabólitos séricos relacionados à disfunção renal, como ureia e creatinina, e demonstrou ser adequada para a quantificação desses analitos, podendo se tornar uma ferramenta diagnóstica com aplicação na prática clínica veterinária.

Palavras-Chave: Doença renal. Soro sanguíneo. Cães e gatos. Diagnóstico. Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

Quantifying Urea and Creatinine in the Blood Serum of Dogs and Cats with Renal Dysfunction Using Raman Spectroscopy

Renal function abnormalities represent a substantial proportion of cases encountered in small animal clinical practice. Among the main forms of renal dysfunction, chronic kidney disease (CKD) and acute kidney injury (AKI) are particularly relevant. Early diagnosis is essential for prognosis and is based on the assessment of biomarkers such as urea and creatinine, while Raman spectroscopy has emerged as a promising diagnostic technique. This study used Raman spectroscopy to evaluate urea and creatinine levels in blood serum samples of cats and dogs with and without renal dysfunction. A total of 89 serum samples were obtained from dogs and cats with and without renal abnormalities. Raman spectra acquired from these samples were evaluated using multivariate methods, including principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) regression, which were employed to identify biochemical differences among the serum samples and to correlate spectral data with biochemical values obtained using a reference technique. Differences in the serum spectra of animals with and without renal abnormalities, together with PCA, revealed distinct spectral profiles between the groups. Peaks associated with proteins and, particularly, urea were significantly more intense in the serum of animals with renal abnormalities, especially in cats. PLS regression enabled the estimation of urea and creatinine concentrations, with correlation coefficients of r = 0.94 and r = 0.89, respectively, for cats, and r = 0.98 and r = 0.93, respectively, for dogs. Classification of the spectra using the PLS regression model according to the presence or absence of renal abnormalities in both species, as well as classification according to the species of origin of the serum samples, resulted in accuracies ranging from 93% to 95%. Raman spectroscopy enabled the identification of spectral peaks associated with serum metabolites related to renal dysfunction, including urea and creatinine, and proved suitable for the quantification of these analytes, indicating its potential as a diagnostic tool for application in veterinary clinical practice.

Keywords: Kidney disease. Blood serum. Dogs and cats. Diagnosis. Raman spectroscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1. Espectroscopia Raman 20

2.2. Morfologia renal de cães e gatos 26

2.3. Fisiologia renal 29

2.4. Insuficiência renal aguda 33

2.5. Doença renal crônica 35

2.6. Biomarcadores renais 37

2.7. Espectroscopia Raman aplicada à avaliação da função renal 40

3. OBJETIVOS 43

3.1. Objetivo geral 43

3.2. Objetivos específicos 43

4. MATERIAIS E MÉTODOS 44

4.1. Aspectos éticos 44

4.2. Amostras biológicas 44

4.3. Aquisição dos espectros Raman 47

4.4. Análise exploratória por análise por componentes principais (PCA) 49

4.5. Análise quantitativa por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) 50

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51

5.1. Espectros Raman dos soros de gatos e cães 51

5.2. Análise exploratória por PCA 57

5.3. Modelo de regressão PLS 63

5.4. Classificação dos espectros: em função da espécie e da alteração renal 68

5.5. Perspectivas futuras e aplicações clínicas na medicina veterinária . 69

6. CONCLUSÃO 71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

ANEXO I – Aprovação CEUA 80

ANEXO II – Autorização do Laboratório parceiro 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos processos de espalhamento Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes durante a interação da radiação com a matéria 22

Figura 2 – Esquema dos principais componentes envolvidos na aquisição dos espectros Raman 25

Figura 3 – Aspectos anatômicos e estruturais dos rins de cão. (A) Vista ventral dos rins, evidenciando as artérias e veias renais, os ureteres e suas relações anatômicas com a aorta, a veia cava caudal e as glândulas adrenais. B) Corte histológico do rim de um cão com cápsula fibrosa, córtex renal, zona externa da medula renal, zona interna da medula renal, papila renal, pelve renal, e ureter..... 28

Figura 4 – Representação do néfron funcional e de seu suprimento sanguíneo, evidenciando um néfron justamedular e os vasos retos. (1) Cápsula de Bowman; (2) túbulo proximal; (3) ramo descendente da alça de Henle; (4) ramo ascendente delgado da alça de Henle; (5) ramo ascendente espesso da alça de Henle; (6) túbulo distal; (7) túbulo conector; (8) túbulo coletor cortical; (9) ducto coletor medular externo; (10) ducto coletor medular interno; (11) arteríola aferente; (12) glomérulo; (13) arteríola aferente; (14) capilares peritubulares; (15) vasos retos; (16) veia renal 31

Figura 5 – Diagramas esquemáticos representando: A) a organização das amostras utilizadas no estudo para avaliação de ureia e creatinina por espectroscopia Raman. B) as etapas do procedimento experimental empregado, incluindo as etapas de coleta das amostras de soro sanguíneo (realizada pelos profissionais dos laboratórios parceiros), armazenamento sob congelamento (−18 °C a −20 °C), descongelamento à temperatura ambiente e preparo das amostras, seguido à análise por espectroscopia Raman, e processamento dos dados espectrais. Após, os dados foram analisados por métodos quimiométricos, incluindo PCA para análise exploratória e regressão PLS para quantificação de ureia e creatinina e classificação 47

Figura 6 – Espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro de: (A) gatos e (B) cães dos grupos Controle e Alterado. A diferença entre os espectros médios (Controle e Alterado) para cada espécie também são mostrados. Os espectros foram deslocados verticalmente e a diferença foi multiplicada por 2 para melhorar a visualização 52

Figura 7 – Plotagem das variáveis da PCA: *loadings* (características espectrais) e *scores* (intensidades) calculadas para os espectros dos gatos. Valores médios dos *scores* dos grupos Controle e Alterado também foram calculados e plotados. Os valores do *Loading*4 e *Score*4 tiveram o eixo vertical invertido para comparação com os mesmos loadings e *scores* dos cães. Os resultados do teste de significância (teste Mann-Whitney, valor de

p) são indicados nos *scores*. *NS* – estatisticamente não significativo 59

Figura 8 – Plotagem das variáveis da PCA: *loadings* (características espectrais) e *scores* (intensidades) calculadas para os espectros dos cães. Valores médios dos *scores* dos grupos Controle e Alterado também foram calculados e plotados. Os resultados do teste de significância (teste Mann-Whitney, valor de *p*) são indicados nos *scores*. *NS* – estatisticamente não significativo 60

Figura 9 – Plotagem dos valores das concentrações reais, obtidas pelo método analítico padrão (colorimetria), versus as concentrações de ureia e creatinina obtidas pelo modelo de regressão PLS aplicada aos espectros de soro de cães e gatos. A1) Ureia em gatos, A2) creatinina em gatos, A3) concentrações reais de ureia versus creatinina em gatos. B1) Ureia em cães, B2) creatinina em cães, B3) concentrações reais de ureia versus creatinina em cães. Os valores dos parâmetros de desempenho da regressão PLS: *r* e RMSE também são apresentados, com o número de LVs no qual esses valores foram obtidos 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição de todos os animais selecionados, separados por espécie (gatos e cães), idade e respectivos valores de ureia e creatinina séricas 46

Tabela 2 – Atribuições dos picos Raman da Figura 6 (espectros médios e diferença entre os espectros) e das Figuras 7 e 8 (*loadings* da PCA) tendo como base os espectros da literatura para espectros Raman de proteínas e lipídios, soro humano e soro de cães 55

Tabela 3 – Tabela de confusão com os resultados da classificação dos espectros por regressão PLS (PLS-DA) em função da presença ou não de alteração renal (Controle e Alterado) para cada espécie e classificação por espécie (cão e gato) 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKI	*acute kidney injury* (insuficiência renal aguda)
un. arb.	unidades arbitrárias
CCD	*charge coupled device* (dispositivo de carga acoplada)
CH_2	grupo metileno
CH_3	grupo metil
CKD	*chronic kidney disease* (doença renal crônica)
DRC	doença renal crônica
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
IgG	imunoglobulina G
IRA	insuficiência renal aguda
IRIS	*International Renal Interest Society* (Sociedade Internacional de Interesse Renal)
LOSOcv	*leave-one-subject-out cross-validation* (validação cruzada deixa-um-sujeito-de-fora)
LV	*latent variable* (variável latente)
NS	não significativo
PC	*principal component* (componente principal)
PCA	*principal component analysis* (análise de componentes principais)
PLS	*partial least squares* (mínimos quadrados parciais)
PLS-DA	*partial least squares discriminant analysis* (discriminação por mínimos quadrados parciais)
r	coeficiente de correlação de Pearson
RMSE	*root mean square error* (raiz quadrada do erro quadrático médio)
RMSEcv	*root mean square error of cross validation* (raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada)
SDMA	dimetilarginina simétrica
TFG	taxa de filtração glomerular

1. INTRODUÇÃO

Os rins são responsáveis pela produção da urina, cuja finalidade é manter o equilíbrio de água e eletrólitos e de excretar os resíduos do metabolismo, mantendo o volume circulatório adequado (TORCHIA et al., 2024). Os rins também secretam hormônios, substâncias reguladoras da pressão arterial, e produzem eritropoetina, que estimula a produção de eritrócitos. A alteração da função renal representa uma das condições patológicas mais prevalentes na rotina clínica veterinária, e, independentemente da etiologia, pode comprometer a manutenção da homeostase do organismo (ROSSI et al., 2022), uma vez que o déficit na função renal acarreta a insuficiência renal e leva a uma falha na homeostase.

A principal disfunção renal é a doença renal crônica (DRC), que consiste em uma condição progressiva e irreversível caracterizada por perda estrutural e/ou funcional dos rins, persistentes por mais de três meses, podendo levar à perda significativa da função renal (MCLELAND et al., 2015; POLZIN, 2011). É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em cães e principalmente em gatos, podendo evoluir de forma silenciosa até estágios avançados (MCLELAND et al., 2015). A insuficiência renal aguda (IRA), por sua vez, consiste em perda súbita e geralmente reversível da função renal. Pode ocorrer devido a uma lesão, medicamentos nefrotóxicos, infecção grave, choque, desidratação ou obstrução das vias urinárias.

A progressão da doença resulta em distúrbios metabólicos, eletrolíticos e clínicos, como poliúria, polidipsia e hipertensão (BARTGES, 2012; BROWN et al., 2016), tornando-se fundamental a avaliação precisa da função renal, tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento terapêutico dos pacientes (BROWN et al., 2016; MCLELAND et al., 2015; O'NEILL et al., 2013). O diagnóstico das disfunções renais consiste em avaliação do histórico do animal, exame físico e exames laboratoriais, como urinálise e exames de sangue, incluindo avaliação de biomarcadores renais, como creatinina e ureia séricas. O diagnóstico precoce é fundamental para a melhora do prognóstico e da qualidade de vida dos animais (BARTGES, 2012; POLZIN, 2011). Em cães e gatos, a classificação e o estadiamento da doença renal seguem as diretrizes da International Renal Interest Society (IRIS) (MCLELAND et al., 2015; O'NEILL et al., 2013), considerando pressão

arterial e parâmetros laboratoriais, incluindo proteinúria, auxiliando assim na padronização do diagnóstico e na definição de protocolos terapêuticos (IRIS, 2026).

A ureia e creatinina são os principais biomarcadores da função renal, inclusive em pequenos animais. A ureia é um metabólito resultante do catabolismo proteico, enquanto a creatinina é derivada do metabolismo da creatina muscular (KARN-ORACHAI; NGAMAROONCHOTE, 2021) e apresenta produção relativamente constante no organismo destes animais, como ocorre com humanos. Apesar de amplamente utilizados na prática clínica, os métodos convencionais para sua quantificação, como os ensaios colorimétricos realizados em equipamentos automatizados de bioquímica clínica, apresentam limitações relacionadas ao tempo de processamento, uso de reagentes e necessidade de infraestrutura laboratorial (GULYAMOV et al., 2021; KANEKO et al., 2008). Diante dessas limitações, novas abordagens têm sido estudadas com o objetivo de desenvolver métodos mais rápidos, sensíveis e menos invasivos para avaliação da função renal. Entre essas abordagens, a espectroscopia Raman tem se destacado no meio científico por analisar fluidos biológicos, onde por meio da interação da luz com as moléculas, permite identificar as ligações químicas presentes em uma amostra, gerando uma impressão espectral característica que permite determinar a sua composição molecular (AUNER et al., 2018; WANG et al., 2015).

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica com grande potencial para a detecção de composição molecular, sem a necessidade de preparo extensivo ou uso de reagentes. A técnica tem potencial para se tornar uma alternativa promissora para diagnóstico de câncer em tecidos e fluidos biológicos (DA SILVA et al., 2024; WANG et al., 2015) e detectar e quantificar metabólitos em soro (CORREIA et al., 2020; GIANSANTE et al., 2022) em humanos. Além disso, a baixa interferência da água permite sua aplicação em amostras biológicas complexas, como urina e saliva (KOSTER et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016), ampliando seu potencial diagnóstico em diferentes campos da medicina humana (HANLON et al., 2000) e veterinária (LOPES et al., 2024). Dentre as vantagens da espectroscopia Raman destaca-se ser minimamente invasiva ou não invasiva (“biópsia óptica”), rápida, com alta resolução e capaz de fornecer resultados em tempo real (HANLON et al., 2000).

A técnica Raman tem sido aplicada na identificação de biomarcadores urinários (ureia, creatinina e glicose) associados ao desenvolvimento de lesões renais decorrentes de doenças metabólicas, como diabetes mellitus e hipertensão

arterial, em análise de urina *in vitro* (BISPO et al., 2013; MOREIRA et al., 2018; SAATKAMP et al., 2016), contribuindo para o diagnóstico precoce e monitoramento da progressão da doença renal (BISPO et al., 2013). O seu uso em avaliações relacionadas a doenças renais tem sido cada vez mais explorado, por detectar alterações bioquímicas em diferentes tipos de amostras biológicas, principalmente de soro (GIANA et al., 2025; GIANSANTE et al., 2022; LOPES et al., 2024) e urina (BISPO et al., 2013; MOREIRA et al., 2018; SAATKAMP et al., 2016).

Devido à complexidade dos dados espectrais gerados, a análise quimiométrica multivariada desempenha papel fundamental na interpretação das informações obtidas. Técnicas baseadas em métodos estatísticos multivariados como a análise de componentes principais (PCA), permitem reduzir a dimensionalidade dos dados, ao mesmo tempo em que busca as maiores variações entre grupos distintos no conjunto de dados, identificando padrões ou agrupamentos entre as amostras. Já métodos de regressão multivariada, como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) possibilitam estabelecer relações quantitativas entre os espectros e as concentrações de analitos específicos obtidos por técnicas padrão (GUO et al., 2018; JOLLIFFE; CADIMA, 2016). No contexto de análise quantitativa dos analitos no soro, modelos de regressão PLS têm sido desenvolvidos para estimar as concentrações de ureia e creatinina em soro humano, utilizando as concentrações obtidas pelos métodos bioquímicos convencionais e os espectros, onde o modelo busca a correlação entre as variáveis espectrais e essas concentrações (GIANA et al., 2025; SAATKAMP et al., 2016). Além das aplicações em medicina humana (BISPO et al., 2013; DA SILVA et al., 2024; GULYAMOV et al., 2021; HANLON et al., 2000; KAMRAN et al., 2024; KARN-ORACHAI; NGAMAROONCHOTE, 2021; SAATKAMP et al., 2016), a espectroscopia Raman tem demonstrado crescente potencial na medicina veterinária, sendo utilizada na investigação de diferentes processos patológicos e na caracterização bioquímica de tecidos e fluidos biológicos de animais (DORAN et al., 2022; DUARTE et al., 2010; GIUSEPPE et al., 2022; LOPES et al., 2024). Destacam-se os estudos de soro de animais infectados com protozoários (gatos com toxoplasmose (DUARTE et al., 2010) e de cães com leishmaniose (GIUSEPPE et al., 2022), diagnóstico de neoplasias em diferentes órgãos e tecidos em cães a partir de avaliação do soro (LOPES et al., 2024), e diagnóstico de câncer cerebral em tecido durante o procedimento intraoperatório em cães (DORAN et al., 2022).

Por ter a capacidade de detectar mudanças químicas e moleculares de forma rápida e com mínimo preparo de amostra (BUTLER et al., 2016; CORREIA et al., 2020; DA SILVA et al., 2024), a espectroscopia Raman tem se tornado uma ferramenta promissora para aplicações diagnósticas, contribuindo para o desenvolvimento de métodos complementares mais rápidos e menos invasivos na avaliação da saúde animal. Com efeito, este estudo tem por objetivo avaliar a aplicação da espectroscopia Raman na detecção e quantificação de ureia e creatinina em amostras de soro sanguíneo de cães e gatos, objetivando investigar o potencial da técnica como ferramenta diagnóstica. Os métodos quimiométricos PCA e regressão PLS foram usados para avaliar as diferenças espectrais entre os grupos com valores fora da faixa de referência – grupo Alterado e com valores dentro da faixa de referência – grupo Controle para cada espécie, e correlacionar os dados espectrais com os valores bioquímicos obtidos por técnica colorimétrica padrão ouro. Este estudo tem o intuito de contribuir para o desenvolvimento da espectroscopia Raman como um método alternativo de diagnóstico e monitoramento de alterações da função renal na medicina veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica de análise molecular baseada no espalhamento da radiação eletromagnética após sua interação com a matéria. A informação obtida por essa técnica está relacionada aos movimentos vibracionais das moléculas e, consequentemente, às ligações químicas que constituem a amostra. Como diferentes estruturas moleculares apresentam comportamentos vibracionais próprios, o espectro Raman pode fornecer informações sobre sua composição química e características estruturais (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; TALARI et al., 2015)

A fonte de excitação utilizada em um espectrômetro Raman é o laser. A radiação laser apresenta propriedades importantes para esse tipo de análise, como elevada intensidade e estreita largura espectral. De acordo com Butler et al. (2016), a emissão em uma faixa muito estreita de comprimentos de onda permite conhecer com precisão a energia da radiação que incide sobre a amostra e, posteriormente, determinar pequenas diferenças entre a energia dos fótons incidentes e daqueles espalhados pelas moléculas. É justamente a medida dessa diferença que permite obter a informação vibracional característica do efeito Raman (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; NOTINGHER, 2007).

A energia de um fóton está relacionada à frequência e ao comprimento de onda da radiação (AUNER et al., 2018). Assim, o comprimento de onda do laser constitui uma característica relevante do sistema Raman e interfere tanto na intensidade do espalhamento quanto na presença de fenômenos como a fluorescência. Em materiais biológicos, a fluorescência pode produzir um sinal de fundo intenso e dificultar a observação das bandas Raman. Por essa razão, lasers que operam na região do infravermelho próximo são frequentemente empregados na análise de tecidos e fluidos biológicos, pois tendem a produzir menor fluorescência do que fontes de excitação na região visível (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

Ao atingir a amostra, o laser interage com os elétrons das moléculas e modifica temporariamente a distribuição de suas cargas. Essa deformação transitória corresponde à polarização molecular. Para que um determinado modo vibracional seja observado no espectro Raman, a vibração precisa produzir uma alteração na polarizabilidade da molécula. Portanto, o efeito Raman não depende apenas da presença de determinada ligação química, mas também da forma como a distribuição eletrônica se modifica durante o movimento vibracional (BUTLER et al., 2016; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; TALARI et al., 2015). Durante essa interação, a maior parte dos fótons é espalhada sem alteração de energia. A radiação espalhada apresenta, nesse caso, a mesma frequência da radiação incidente, retornando ao mesmo nível vibracional, ou seja, não há diferença de energia entre os fótons incidente e espalhado, ocorrendo o espalhamento Rayleigh (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; TALARI et al., 2015). Uma parcela muito menor dos fótons, entretanto, troca energia com os modos vibracionais da molécula. Quando o retorno acontece com um nível vibracional diferente, há transferência de energia e ocorre o espalhamento inelástico Raman. Como o espalhamento Raman ocorre em proporção muito inferior ao Rayleigh, sua detecção depende de um sistema óptico suficientemente sensível para separar e registrar essa pequena parcela da radiação (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; NOTINGHER, 2007).

Duas situações podem resultar desse processo inelástico. Quando uma molécula inicialmente no estado vibracional fundamental recebe energia do fóton, a radiação espalhada apresenta energia menor que a incidente, dando origem ao espalhamento Stokes. No espalhamento anti-Stokes ocorre o inverso: uma molécula que já se encontra em estado vibracional excitado transfere energia ao fóton, que é espalhado com energia maior. À temperatura ambiente, a população de moléculas no estado vibracional fundamental é superior àquela encontrada em estados excitados. Por esse motivo, Notingher (2007) descreve que o espalhamento Stokes apresenta maior intensidade e é o mais utilizado nas análises Raman. Conforme apresentado na Figura 1, a interação da radiação incidente com as moléculas pode resultar em diferentes processos de espalhamento.

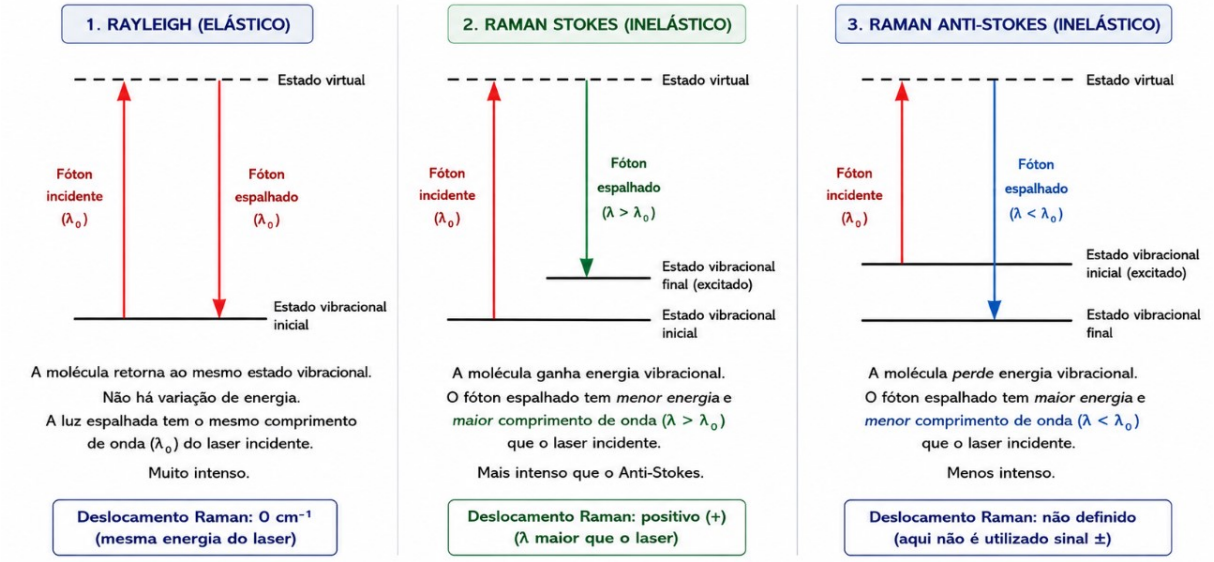


Figura 1 – Representação esquemática dos processos de espalhamento Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes durante a interação da radiação com a matéria.
Fonte: elaborado pelo autor (2026).

A diferença entre as energias das radiações incidente e espalhada é representada pelo deslocamento Raman, convencionalmente expresso em número de onda (cm^{-1}). Em vez de indicar o comprimento de onda absoluto da luz detectada, o deslocamento mostra quanto a frequência do fóton se modificou em relação à frequência do laser de excitação. Como essa diferença corresponde à energia envolvida nas vibrações moleculares, a posição das bandas no espectro fornece informações relacionadas aos grupos químicos e às ligações existentes na amostra (BUTLER et al., 2016; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; TALARI et al., 2015).

O resultado da análise é apresentado na forma de um espectro, no qual a intensidade da radiação espalhada é representada em função do deslocamento Raman (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; NOTINGHER, 2007). A posição de uma banda está associada ao modo vibracional que contribuiu para sua formação (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; TALARI et al., 2015), enquanto sua intensidade depende de diferentes fatores, incluindo a polarizabilidade molecular, a concentração do componente e as características da amostra. Em materiais biologicamente complexos, como tecidos e fluidos corporais, o espectro resulta da contribuição simultânea de numerosas moléculas. Por isso, o perfil espectral representa uma informação global da composição molecular da amostra, e não simplesmente a resposta de um único constituinte (BUTLER et al., 2016; GUALERZI

et al., 2017; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; TALARI et al., 2015).

Para que essa interação entre a radiação e a matéria possa ser registrada, o espectrômetro Raman reúne diferentes componentes ópticos e eletrônicos. De modo geral, o equipamento é constituído por uma fonte laser, um conjunto óptico responsável por conduzir e focalizar a radiação sobre a amostra, um sistema para coletar a luz espalhada, filtros ópticos, um espectrógrafo e um detector. Cada componente exerce uma função específica e interfere na qualidade do espectro produzido (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

O processo de aquisição começa com a emissão do laser, cujo feixe é conduzido até a amostra e focalizado na região que será analisada. Dependendo da configuração do instrumento, a condução da luz pode ocorrer por elementos ópticos convencionais ou por fibras ópticas conectadas a uma sonda. O emprego de fibras permite que a fonte de excitação e o sistema de detecção permaneçam fisicamente separados do local onde a amostra é posicionada, proporcionando maior flexibilidade na aquisição dos espectros. Uma configuração utilizada em sistemas Raman é a geometria de retroespalhamento. Nessa disposição, a radiação de excitação é direcionada para a amostra e parte da luz espalhada é coletada aproximadamente pela mesma região óptica utilizada para a incidência do laser. A sonda pode, portanto, desempenhar simultaneamente as funções de conduzir a radiação incidente e coletar o sinal produzido após a interação com a amostra. (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000).

Depois da filtragem, a radiação é encaminhada ao espectrógrafo, onde os diferentes comprimentos de onda são separados espacialmente. Essa função pode ser realizada por uma grade de difração, cuja superfície apresenta grande número de linhas capazes de dispersar a luz em função de seu comprimento de onda. A radiação separada é então direcionada ao detector, possibilitando registrar simultaneamente as intensidades correspondentes a diferentes regiões espectrais (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; NOTINGHER, 2007).

Entre os detectores utilizados em sistemas Raman encontram-se os do tipo dispositivo de carga acoplada (*charge-coupled device* – CCD). Os fótons que atingem o detector são convertidos em sinais elétricos, posteriormente processados para a formação do espectro. Como o espalhamento Raman é pouco intenso, a

utilização de detectores de elevada sensibilidade é importante para a aquisição do sinal. Detectores CCD refrigerados são empregados em sistemas Raman com a finalidade de favorecer a obtenção de sinais de baixa intensidade (NOTINGHER, 2007).

O tempo durante o qual o detector registra a radiação, denominado tempo de integração, também influencia o espectro. Tempos mais prolongados permitem coletar maior quantidade de fótons e podem melhorar a relação sinal-ruído. Outra estratégia consiste em realizar sucessivas aquisições da mesma amostra e utilizar o conjunto dos espectros obtidos para reduzir a influência de flutuações aleatórias. A escolha desses parâmetros deve equilibrar a qualidade necessária para a análise com o tempo de aquisição e a exposição da amostra ao laser (BUTLER et al., 2016**).**

A capacidade do equipamento de distinguir bandas espectrais próximas está relacionada à sua resolução espectral. Esse parâmetro deve ser considerado de acordo com as características do sistema empregado e com a região espectral de interesse, particularmente em amostras complexas, nas quais diferentes vibrações moleculares podem produzir bandas em regiões próximas do espectro (BUTLER et al., 2016).

Além das características do espectrômetro, alguns parâmetros empregados durante a aquisição interferem diretamente na qualidade do sinal. A potência do laser é um deles. O aumento da potência eleva a quantidade de fótons que alcança a amostra e pode melhorar a intensidade do sinal Raman. Esse aumento, entretanto, não pode ser realizado de forma indiscriminada, pois a exposição excessiva à radiação pode produzir aquecimento ou alterações na amostra. A potência deve ser definida considerando as características do material, o comprimento de onda da fonte e o período de exposição (BUTLER et al., 2016).

A fluorescência merece atenção especial na análise de materiais biológicos. Quando determinadas moléculas absorvem a radiação incidente e posteriormente emitem luz, forma-se um sinal de fundo que pode ser consideravelmente mais intenso do que o espalhamento Raman. Esse fenômeno pode encobrir parcial ou completamente as bandas vibracionais. A escolha do comprimento de onda do laser constitui uma das estratégias utilizadas para minimizar esse efeito, sendo comum o emprego de fontes próximas de 785 ou 830 nm em aplicações biomédicas (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007). O emprego de uma fonte de excitação em 830 nm é compatível com a análise de

materiais biológicos por estar situado na região do infravermelho próximo, na qual a contribuição da fluorescência tende a ser reduzida. A associação entre laser, sonda óptica, sistema de dispersão e detector refrigerado permite registrar o fraco espalhamento inelástico produzido pelas moléculas presentes na amostra e convertê-lo em um espectro capaz de representar suas características vibracionais (BUTLER et al., 2016; CORREIA et al., 2020; HANLON et al., 2000; MOREIRA et al., 2018; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007). Os principais componentes envolvidos na aquisição dos espectros Raman, bem como o percurso da radiação desde a fonte de excitação até a obtenção do espectro, estão representados na Figura 2.

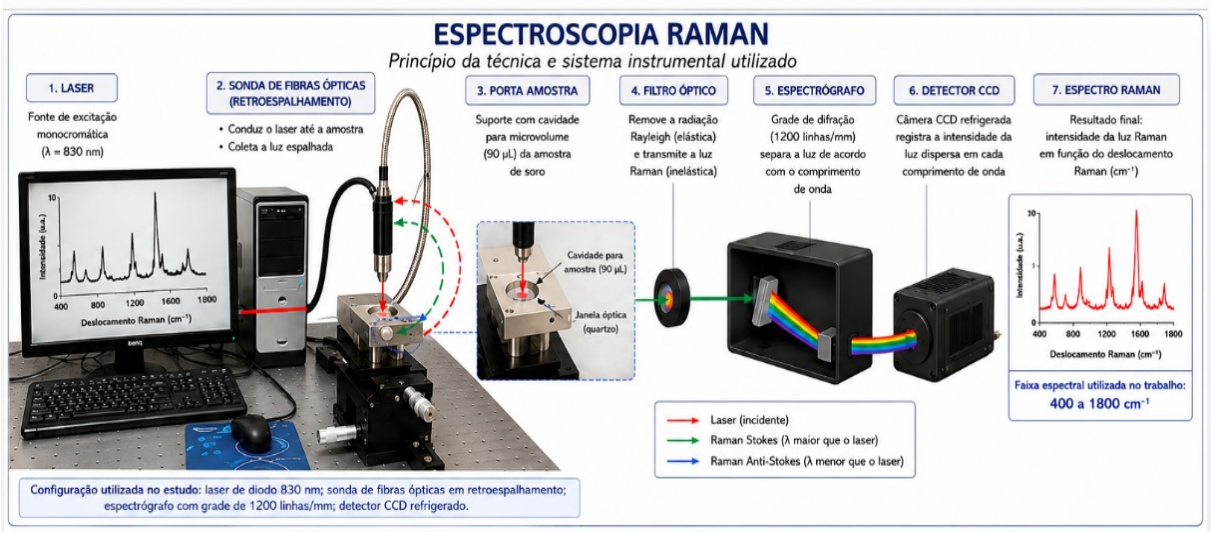


Figura 2 – Esquema dos principais componentes envolvidos na aquisição dos espectros Raman.
Fonte: elaborado pelo autor (2026).

Em síntese, a obtenção de um espectro Raman envolve uma sequência de fenômenos físicos e etapas instrumentais interdependentes: A radiação laser alcança a amostra e interage com suas moléculas, uma pequena fração apresenta alteração de energia e origina o efeito Raman. O sistema óptico coleta essa radiação, remove o componente elástico predominante e separa os diferentes comprimentos de onda antes de sua detecção. O sinal registrado é então convertido em um espectro no qual as bandas refletem os modos vibracionais das moléculas presentes na amostra (BUTLER et al., 2016; HANLON et al., 2000; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; TALARI et al., 2015).

A compreensão desses princípios físicos e dos componentes instrumentais é necessária para interpretar adequadamente as informações obtidas pela espectroscopia Raman. Em uma matriz biologicamente complexa, o espectro resulta da interação da radiação com diferentes constituintes presentes simultaneamente, de modo que alterações na composição molecular podem modificar tanto a posição quanto, principalmente, a intensidade e o perfil das bandas observadas. Esse fundamento permite compreender as aplicações da técnica em materiais biológicos abordadas posteriormente nesta dissertação (BUTLER et al., 2016; GUALERZI et al., 2017; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; TALARI et al., 2015).

2.2. Morfologia renal de cães e gatos

O conhecimento da organização anatômica e histológica dos rins constitui a base para a compreensão dos mecanismos fisiológicos responsáveis pela manutenção da homeostase e das alterações decorrentes das nefropatias. Em cães e gatos, os rins estão localizados no espaço retroperitoneal e revestidos externamente por uma cápsula fibrosa. Embora apresentem organização anatômica semelhante entre as espécies, particularidades relacionadas ao tamanho, posicionamento, mobilidade e vascularização superficial podem ser observadas, especialmente nos felinos (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014). A disposição anatômica dos rins no cão e sua relação com os principais vasos sanguíneos e estruturas adjacentes estão ilustradas na Figura 3A.

Histologicamente, o parênquima renal encontra-se organizado em duas regiões principais: córtex e medula. O córtex corresponde à porção mais externa e contém os corpúsculos renais, constituídos pelos glomérulos e pela cápsula de Bowman, além dos túbulos contorcidos proximais e distais. A medula ocupa a região interna e apresenta organização predominantemente tubular, incluindo as alças de Henle e os ductos coletores. Essa disposição estrutural possibilita a integração entre filtração glomerular, processamento tubular e formação da urina (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014). A organização das principais regiões do parênquima renal está apresentada na Figura 3B. (KÖNIG; LIEBICH, 2016).

O néfron constitui a unidade estrutural e funcional do rim. Seu segmento inicial corresponde ao corpúsculo renal, no qual o glomérulo se encontra envolvido

pela cápsula de Bowman. A partir dessa estrutura, o filtrado percorre o túbulo contorcido proximal, a alça de Henle e o túbulo contorcido distal, seguindo posteriormente para o sistema coletor. A organização sequencial desses segmentos permite que o ultrafiltrado plasmático seja progressivamente modificado até a formação da urina definitiva (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014; TORCHIA et al., 2024).

No corpúsculo renal, a barreira de filtração glomerular é constituída pelo endotélio fenestrado dos capilares glomerulares, pela membrana basal e pelos podócitos que compõem o folheto visceral da cápsula de Bowman. Essa estrutura apresenta elevada seletividade e permite a passagem de água e de diversos solutos de baixo peso molecular, enquanto restringe a passagem de elementos celulares e macromoléculas plasmáticas. A preservação de sua integridade é, portanto, indispensável para a manutenção adequada da filtração glomerular (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014). Alterações na permeabilidade da barreira glomerular podem favorecer a passagem excessiva de proteínas para o filtrado e, consequentemente, a perda urinária de proteínas (GALVÃO et al., 2010).

A vascularização renal também se encontra intimamente relacionada à organização funcional do néfron. O sangue alcança os glomérulos pelas arteríolas aferentes e, após percorrer os capilares glomerulares, deixa essa região pelas arteríolas eferentes. A partir destas, forma-se uma rede vascular associada aos túbulos renais, constituída pelos capilares peritubulares e vasos retos, que participa das trocas envolvidas nos processos de reabsorção e secreção e contribui para a manutenção do gradiente osmótico medular (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014).

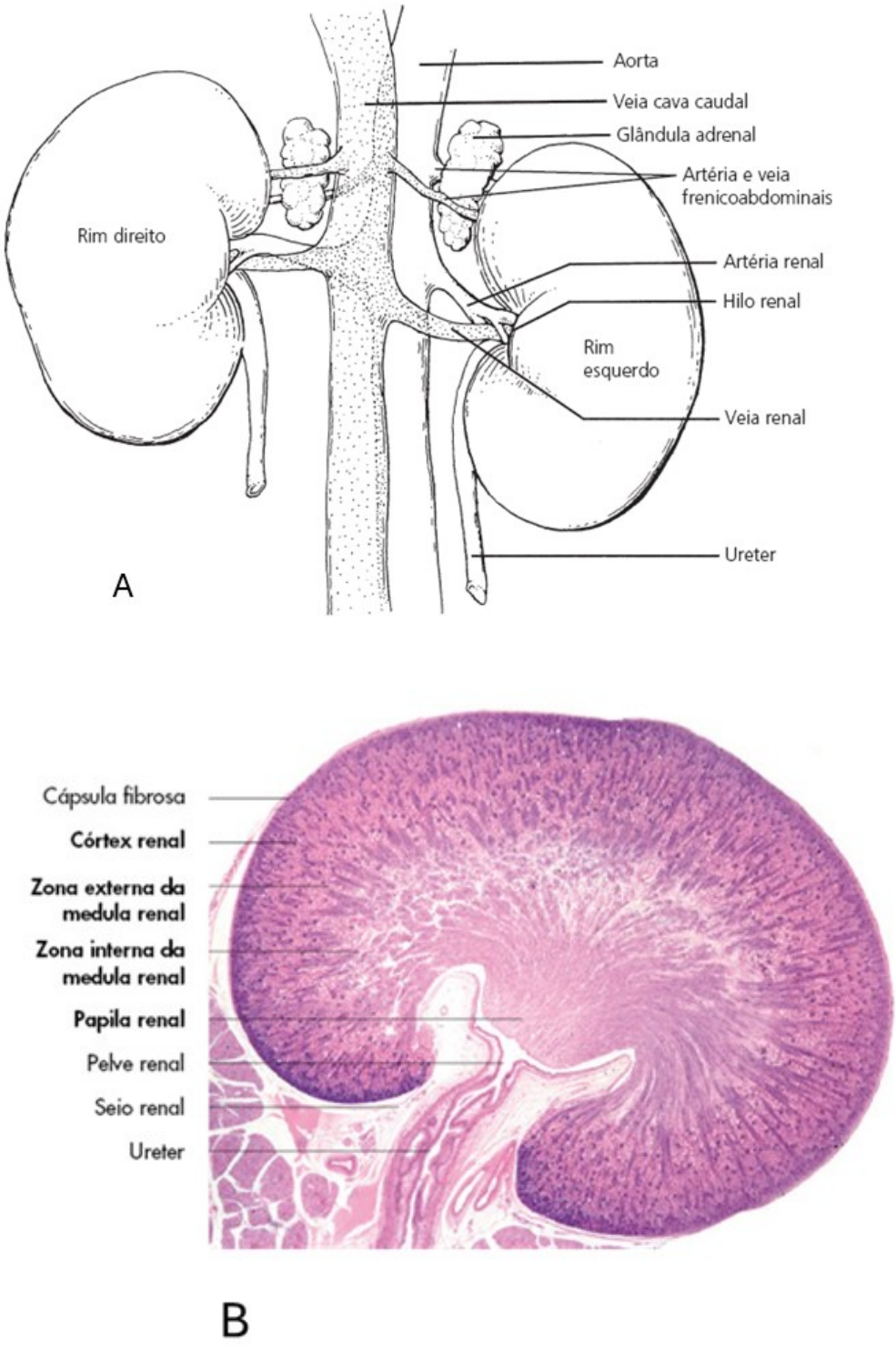


Figura 3 – Aspectos anatômicos e estruturais dos rins de cão. (A) Vista ventral dos rins, evidenciando as artérias e veias renais, os ureteres e suas relações anatômicas com a aorta, a veia cava caudal e as glândulas adrenais. B) Corte histológico do rim de um cão com cápsula fibrosa, córtex renal, zona externa da medula renal, zona interna da medula renal, papila renal, pelve renal, e ureter.
Fonte: (A) Reece (2017, p.153); (B) König e Liebich (2011, p.417).

Embora cães e gatos apresentem organização renal semelhante, particularidades fisiológicas relacionadas à conservação de água e à capacidade de concentração urinária devem ser consideradas. Os felinos apresentam capacidade acentuada de produzir urina concentrada, característica relacionada à fisiologia da espécie, enquanto nos cães pode existir maior variabilidade de acordo com características individuais e fisiológicas (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014). A capacidade de concentração urinária constitui uma função importante dos rins e está diretamente relacionada à conservação de água e à manutenção da homeostase. Alterações estruturais e funcionais do parênquima renal podem comprometer essa capacidade e resultar em redução da concentração urinária, poliúria e polidipsia, achados frequentemente observados durante a evolução da doença renal crônica (GALVÃO et al., 2010; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014; WAKI et al., 2010).

A relação entre estrutura e função torna-se particularmente importante diante do desenvolvimento das doenças renais. Lesões glomerulares podem comprometer a filtração e a seletividade da barreira glomerular, enquanto alterações tubulares e intersticiais podem interferir nos mecanismos de reabsorção, secreção e concentração urinária. A perda progressiva de néfrons funcionais desencadeia mecanismos compensatórios nas unidades remanescentes, incluindo hiperfiltração e hipertensão glomerular, que inicialmente contribuem para a manutenção da função, mas podem favorecer a progressão da lesão. Com a redução progressiva da taxa de filtração glomerular, ocorre diminuição da capacidade de depuração renal e aumento das concentrações séricas de compostos nitrogenados, entre eles ureia e creatinina (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

2.3. Fisiologia renal

Os rins exercem funções essenciais para a manutenção da homeostase, participando continuamente da regulação do volume e da composição dos líquidos corporais, do equilíbrio eletrolítico e ácido-base e da eliminação de produtos provenientes do metabolismo. Além dessas atividades excretoras e regulatórias, apresentam funções endócrinas relacionadas ao controle da pressão arterial, à

eritropoiese e ao metabolismo mineral (GALVÃO et al., 2010; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KLEIN, 2014; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A formação da urina inicia-se pela filtração glomerular, processo no qual parte do plasma atravessa a barreira de filtração e origina um ultrafiltrado contendo água e diferentes solutos. Esse movimento resulta do equilíbrio entre as forças hidrostáticas e oncóticas presentes nos capilares glomerulares e no espaço de Bowman. A quantidade de filtrado produzida por unidade de tempo corresponde à taxa de filtração glomerular (TFG), considerada um dos principais indicadores da função renal (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KLEIN, 2014; TORCHIA et al., 2024).

A manutenção da TFG depende, entre outros fatores, do fluxo sanguíneo renal e da resistência vascular exercida pelas arteríolas aferentes e eferentes. Mecanismos de autorregulação contribuem para manter relativamente constantes o fluxo sanguíneo renal e a filtração diante de variações moderadas da pressão arterial. Essa regulação é importante para preservar a função dos glomérulos e limitar os efeitos das oscilações hemodinâmicas sobre a formação do filtrado (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014).

Após a filtração, o ultrafiltrado percorre os diferentes segmentos do néfron e sofre modificações substanciais em sua composição. A reabsorção tubular permite o retorno de água e de substâncias necessárias ao organismo para a circulação, enquanto a secreção tubular possibilita a transferência de determinados compostos do sangue para o lúmen tubular. Dessa forma, a composição final da urina resulta da integração entre filtração glomerular, reabsorção e secreção tubular (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KLEIN, 2014). A organização funcional do néfron e sua relação com o suprimento sanguíneo estão representadas na Figura 4.

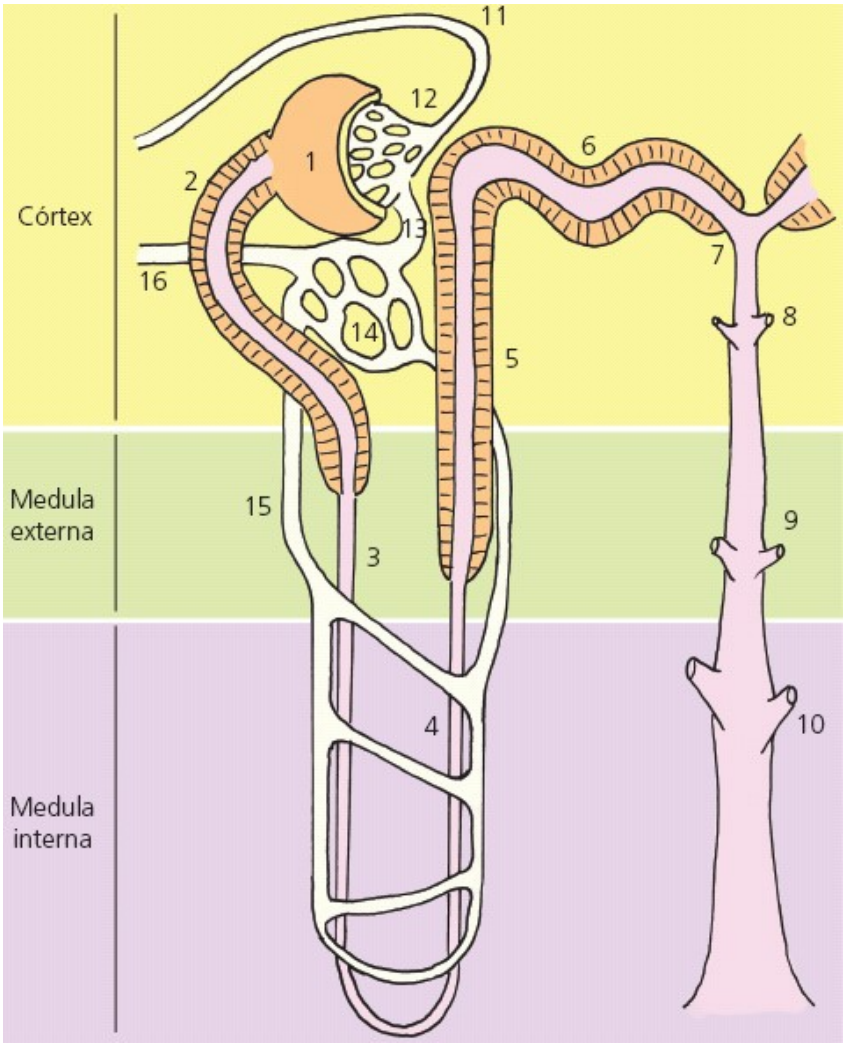


Figura 4 – Representação do néfron funcional e de seu suprimento sanguíneo, evidenciando um néfron justamedular e os vasos retos. (1) Cápsula de Bowman; (2) túbulo proximal; (3) ramo descendente da alça de Henle; (4) ramo ascendente delgado da alça de Henle; (5) ramo ascendente espesso da alça de Henle; (6) túbulo distal; (7) túbulo conector; (8) túbulo coletor cortical; (9) ducto coletor medular externo; (10) ducto coletor medular interno; (11) arteríola aferente; (12) glomérulo; (13) arteríola aferente; (14) capilares peritubulares; (15) vasos retos; (16) veia renal. Fonte: Adaptado de Reece (2017).

O túbulo contorcido proximal é responsável por parcela expressiva da reabsorção de água e eletrólitos, além da recuperação de glicose, aminoácidos e bicarbonato. A alça de Henle participa da formação e manutenção do gradiente osmótico medular necessário à concentração da urina. Nos segmentos distais e nos ductos coletores ocorre o ajuste final da composição e do volume urinários, permitindo que a excreção renal seja adaptada às necessidades fisiológicas do organismo (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KLEIN, 2014).

A regulação do processamento tubular envolve diferentes mecanismos hormonais. A aldosterona participa do controle da reabsorção de sódio e da excreção de potássio, enquanto o hormônio antidiurético modifica a permeabilidade dos ductos coletores à água. A integração desses mecanismos contribui para o controle da osmolaridade plasmática, do volume circulante e da capacidade de concentração urinária (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014).

Os rins também exercem papel central na manutenção do equilíbrio ácido-base por meio da reabsorção do bicarbonato filtrado, da secreção de íons hidrogênio e da geração de novo bicarbonato. Paralelamente, regulam a excreção ou retenção de eletrólitos como sódio, potássio, cálcio e fósforo (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KLEIN, 2014). O comprometimento dessas funções nas nefropatias pode, portanto, produzir alterações sistêmicas importantes (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A função endócrina renal compreende, entre outros mecanismos, a produção de renina e eritropoietina e a participação na ativação da vitamina D. A renina integra o sistema renina-angiotensina-aldosterona, envolvido no controle da pressão arterial e da volemia. A eritropoietina participa do estímulo à produção de eritrócitos na medula óssea, enquanto a formação do calcitriol contribui para a homeostase do cálcio e do fósforo (GALVÃO et al., 2010; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014; TORCHIA et al., 2024).

A manutenção das concentrações séricas de ureia e creatinina está relacionada ao funcionamento renal. A ureia, produzida predominantemente no fígado a partir do metabolismo nitrogenado, é filtrada pelos glomérulos e apresenta reabsorção tubular parcial. A creatinina, originada principalmente do metabolismo da creatina muscular, é eliminada predominantemente por filtração glomerular (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KLEIN, 2014; TORCHIA et al., 2024). Consequentemente, reduções relevantes da função renal podem favorecer o acúmulo desses compostos na circulação **(**BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A compreensão da fisiologia renal permite interpretar como alterações da perfusão, da filtração e do processamento tubular podem resultar em comprometimento da homeostase. Quando essas alterações se instalam rapidamente, podem caracterizar injúria renal aguda; quando persistem e são

acompanhadas por perda progressiva de tecido funcional, podem resultar em doença renal crônica **(**BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

2.4. Insuficiência renal aguda

A insuficiência renal aguda (IRA) caracteriza-se por redução abrupta da função renal, instalada em período relativamente curto e associada ao comprometimento da capacidade de filtração e manutenção da homeostase. Como consequência, podem ocorrer retenção de produtos nitrogenados, alterações hidroeletrolíticas e ácido-base e modificações no volume urinário. Diferentemente da doença renal crônica (DRC), a injúria aguda pode apresentar potencial de recuperação funcional, particularmente quando o fator desencadeante é identificado e corrigido antes do estabelecimento de lesões permanentes (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014).

Do ponto de vista fisiopatológico, as alterações associadas à IRA podem ser classificadas em pré-renais, renais ou intrínsecas e pós-renais. A condição pré-renal está relacionada à redução da perfusão dos rins sem comprometimento estrutural inicial do parênquima. Situações capazes de reduzir o volume circulante ou a pressão de perfusão podem diminuir a TFG e, quando persistentes, favorecer o desenvolvimento de lesão isquêmica renal (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014).

A injúria renal intrínseca envolve comprometimento direto das estruturas do parênquima, incluindo túbulos, glomérulos, interstício ou vascularização renal. Eventos isquêmicos, agentes nefrotóxicos e determinados processos infecciosos ou inflamatórios podem produzir lesões estruturais e comprometer simultaneamente os mecanismos de filtração, reabsorção e secreção (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014).

O comprometimento tubular assume particular importância na fisiopatologia da IRA, uma vez que o epitélio tubular participa ativamente da reabsorção e secreção de água, eletrólitos e metabólitos. Lesões nesse compartimento interferem na modificação do filtrado glomerular e podem contribuir para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e hidroeletrolíticos (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014).

As alterações pós-renais estão relacionadas ao comprometimento da eliminação da urina após sua formação, como pode ocorrer diante de obstruções ou ruptura das vias urinárias. Nessas situações, o aumento da pressão no sistema urinário pode interferir na filtração glomerular e promover retenção de compostos normalmente eliminados pelos rins (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014).

A manifestação clínica da IRA varia de acordo com sua etiologia e com a intensidade do comprometimento funcional. Alguns pacientes podem desenvolver redução expressiva do volume urinário, caracterizada por oligúria ou anuria, enquanto outros podem apresentar injúria renal sem diminuição acentuada da produção de urina. Alterações eletrolíticas e ácido-base, como acidose metabólica, também podem acompanhar os casos de maior gravidade (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KLEIN, 2014).

O diagnóstico deve considerar de maneira integrada o histórico, os achados clínicos, a produção urinária e os resultados laboratoriais. A investigação de episódios de hipoperfusão, exposição a substâncias potencialmente nefrotóxicas, infecções ou alterações do fluxo urinário pode auxiliar na identificação do fator desencadeante (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014).

A ureia e a creatinina são amplamente utilizadas na avaliação da função renal e na identificação da azotemia. Entretanto, alterações renais podem estar presentes antes de elevações expressivas desses marcadores, o que limita sua utilização isolada para o reconhecimento muito precoce de determinadas injúrias (GALVÃO et al., 2010; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A evolução da IRA depende da etiologia, da extensão do dano e da possibilidade de intervenção sobre a causa primária. Enquanto alguns pacientes podem apresentar recuperação funcional significativa, lesões mais extensas podem resultar em perda permanente de néfrons e favorecer o desenvolvimento posterior de alterações renais crônicas (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; POLZIN, 2011).

Dessa maneira, apesar de IRA e DRC apresentarem mecanismos e evolução distintos, existe continuidade fisiopatológica entre determinadas agressões agudas e o estabelecimento de lesões renais persistentes, ressaltando a importância

do reconhecimento precoce das alterações funcionais e estruturais (BARTGES, 2012; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; POLZIN, 2011).

2.5. Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela presença persistente de alterações estruturais ou funcionais nos rins, associadas à perda progressiva da capacidade de manutenção da homeostase. A evolução da doença compromete não apenas a eliminação de metabólitos, mas também funções regulatórias e endócrinas desempenhadas pelo tecido renal (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; ROSSI et al., 2022; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A DRC apresenta elevada importância clínica em pequenos animais, sobretudo na população geriátrica. Na espécie felina, a DRC é particularmente frequente em animais idosos e apresenta prevalência superior à observada em cães. Entre as alterações histopatológicas descritas nos rins de gatos acometidos destacam-se inflamação intersticial, degeneração e atrofia tubular, fibrose intersticial e glomeruloesclerose, cuja intensidade pode aumentar com a progressão da doença (BROWN et al., 2016; MCLELAND et al., 2015). Diferentes fatores têm sido associados à ocorrência e à progressão da DRC felina, incluindo idade, condições concomitantes e alterações relacionadas à própria progressão da lesão renal (BROWN et al., 2016). Em cães, a DRC também apresenta associação com o avanço da idade, e fatores como determinadas raças e características individuais podem estar relacionados ao maior risco de ocorrência da doença (O'NEILL et al., 2013).

A etiologia da DRC pode ser heterogênea e, em muitos pacientes, a causa inicialmente responsável pela lesão não é identificada no momento do diagnóstico. As glomerulopatias, doenças túbulo-intersticiais, pielonefrite crônica, alterações hereditárias ou congênitas e sequelas de lesões renais previamente estabelecidas podem resultar em perda permanente de néfrons. Apesar da diversidade das causas iniciais, a progressão tende a convergir para mecanismos fisiopatológicos semelhantes (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; POLZIN, 2011; WAKI et al., 2010).

A diminuição do número de néfrons funcionais induz adaptações compensatórias nas unidades remanescentes. O aumento da filtração por néfron

contribui inicialmente para a manutenção da função renal global; entretanto, a persistência desse mecanismo pode promover hipertensão intraglomerular e sobrecarga funcional. Dessa forma, uma resposta inicialmente adaptativa pode, ao longo do tempo, participar da perpetuação da lesão renal (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024).

Alterações progressivas da barreira glomerular podem favorecer o aumento da passagem de proteínas para o filtrado e o desenvolvimento de proteinúria. Paralelamente, o comprometimento tubular e intersticial pode desencadear mecanismos inflamatórios, resultando em fibrose, atrofia tubular e perda adicional de unidades funcionais. A interação entre esses processos estabelece um ciclo de progressão no qual a redução da massa renal amplia a sobrecarga dos néfrons remanescentes (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024).

Com a progressão da DRC, ocorre comprometimento da capacidade renal de concentrar a urina, podendo resultar em poliúria e polidipsia. A perda funcional também interfere na manutenção do equilíbrio ácido-base, na excreção de fósforo e no metabolismo da vitamina D. Em estágios mais avançados, a diminuição da produção renal de eritropoietina pode contribuir para o desenvolvimento de anemia não regenerativa (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A redução progressiva da TFG compromete a depuração de produtos nitrogenados e favorece a elevação das concentrações séricas de ureia e creatinina. Essas alterações constituem importantes indicadores laboratoriais da redução da função excretora renal, embora devam ser interpretadas em conjunto com outros parâmetros clínicos e laboratoriais (GALVÃO et al., 2010; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

O estadiamento da DRC permite organizar os pacientes de acordo com o grau de comprometimento renal e fornece subsídios para avaliação prognóstica, acompanhamento e definição da conduta terapêutica. O sistema proposto pela IRIS é aplicável a cães e gatos com DRC estável e utiliza as concentrações de creatinina e SDMA como marcadores relacionados à TFG para estabelecer os estágios da doença (IRIS, 2026; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010). A utilização desses dois marcadores permite uma avaliação mais abrangente, particularmente em situações nas quais existam discrepâncias entre suas

concentrações, como pode ocorrer em pacientes com redução significativa da massa muscular (TORCHIA et al., 2024).

A DRC é classificada em quatro estágios de acordo com o grau de comprometimento da função renal. O estágio 1 compreende animais sem azotemia evidente, mas que apresentam outras evidências persistentes de doença renal. Os estágios subsequentes refletem graus progressivamente maiores de comprometimento funcional e azotemia, até o estágio 4, caracterizado por perda funcional mais acentuada e maior possibilidade de manifestações clínicas relacionadas à uremia (IRIS, 2026; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A utilização conjunta dos parâmetros laboratoriais assume relevância porque alterações renais podem estar presentes antes do estabelecimento de azotemia expressiva. Assim, concentrações de creatinina ainda dentro do intervalo de referência não excluem doença renal quando existem outros indícios persistentes, como aumento de SDMA, alterações na capacidade de concentração urinária, proteinúria de origem renal ou alterações estruturais identificadas por métodos de imagem (IRIS, 2026; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

Após o estabelecimento do estágio, a IRIS recomenda o subestadiamento com base na proteinúria e na pressão arterial sistêmica. Esses parâmetros acrescentam informações sobre risco de progressão da doença e de lesão em órgãos-alvo e auxiliam na individualização da avaliação e do acompanhamento do paciente (IRIS, 2026; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A necessidade de integrar diferentes parâmetros evidencia que a DRC não deve ser avaliada exclusivamente pela concentração de um único analito. A interpretação conjunta das alterações clínicas, laboratoriais e estruturais possibilita caracterizar de maneira mais adequada o grau de comprometimento renal e acompanhar sua progressão (BARTGES, 2012; GALVÃO et al., 2010; POLZIN, 2011; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

2.6. Biomarcadores renais

Os biomarcadores renais correspondem a parâmetros mensuráveis em fluidos biológicos capazes de fornecer informações relacionadas à função ou à integridade estrutural dos rins. Na prática clínica, sua interpretação auxilia na identificação, caracterização e acompanhamento das nefropatias. Entretanto,

considerando a complexidade funcional renal, nenhum marcador isolado representa integralmente todos os componentes envolvidos na filtração, no processamento tubular e na lesão tecidual (GALVÃO et al., 2010; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022; WAKI et al., 2010).

Entre os biomarcadores tradicionalmente empregados na medicina veterinária, ureia e creatinina apresentam particular importância devido à sua ampla disponibilidade laboratorial e à relação de suas concentrações com a função renal. A redução da capacidade de depuração favorece o acúmulo desses metabólitos na circulação, permitindo sua utilização na identificação e no acompanhamento da azotemia (GALVÃO et al., 2010; JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2014; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022).

A creatinina é um produto derivado do metabolismo da creatina, presente predominantemente no tecido muscular. Sua produção ocorre de maneira relativamente constante em condições fisiológicas, e sua eliminação é realizada principalmente por filtração glomerular. Com a redução da TFG, a depuração de creatinina diminui e sua concentração sérica tende a aumentar, justificando sua utilização como marcador indireto da função renal (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

Apesar de sua ampla utilização, a creatinina apresenta limitações importantes. Sua concentração sérica pode ser influenciada pela massa muscular, de modo que animais com maior quantidade de tecido muscular podem apresentar concentrações basais relativamente superiores, enquanto indivíduos idosos, caquéticos ou com redução acentuada da massa magra podem apresentar valores inferiores aos esperados para o grau de comprometimento renal (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022; TORCHIA et al., 2024). Outra limitação está relacionada à sensibilidade nas fases iniciais da perda funcional. Reduções discretas da TFG podem não promover imediatamente elevação da creatinina acima dos intervalos laboratoriais de referência. Consequentemente, sua interpretação deve considerar a evolução do paciente e ser associada a outros indicadores de função e lesão renal (IRIS, 2026; ROSSI et al., 2022; TORCHIA et al., 2024; WAKI et al., 2010).

A dimetilarginina simétrica (SDMA) constitui um biomarcador relacionado à filtração glomerular e apresenta menor influência da massa muscular quando comparada à creatinina. Essa característica pode ser particularmente relevante em

animais com redução da condição muscular, nos quais a interpretação isolada da creatinina pode subestimar o comprometimento da função renal (IRIS, 2026; ROSSI et al., 2022; TORCHIA et al., 2024).

A SDMA foi incorporada ao sistema de estadiamento da DRC da IRIS e deve ser interpretada em conjunto com a creatinina e os demais achados clínicos e laboratoriais. A utilização simultânea de ambos os marcadores pode auxiliar na avaliação de pacientes nos quais exista discrepância entre suas concentrações e contribuir para caracterização mais adequada da perda funcional (IRIS, 2026; TORCHIA et al., 2024).

A ureia é sintetizada predominantemente no fígado como produto final do metabolismo nitrogenado e posteriormente transportada pela circulação até os rins. Após ser filtrada nos glomérulos, parte da ureia pode ser reabsorvida ao longo do sistema tubular. A redução da função renal favorece sua retenção e consequente aumento da concentração sanguínea, justificando sua utilização tradicional em associação à creatinina (GALVÃO et al., 2010; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022). Entretanto, a concentração sérica de ureia não depende exclusivamente da função renal. Fatores relacionados à alimentação, ao estado de hidratação, ao catabolismo proteico e a outras condições clínicas podem modificar suas concentrações. Por essa razão, a elevação da ureia deve ser interpretada em conjunto com a creatinina, os achados clínicos e outros parâmetros laboratoriais (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022).

Além dos marcadores séricos, a proteinúria fornece informações relevantes sobre o comprometimento renal. A presença persistente de proteínas na urina, após exclusão de possíveis causas pré-renais e pós-renais, pode refletir alterações da barreira de filtração glomerular ou da capacidade tubular de reabsorção (BARTGES, 2012; IRIS, 2026; POLZIN, 2011). A relação proteína/creatinina urinária permite quantificar a proteinúria e integra o subestadiamento recomendado pela IRIS para cães e gatos com DRC. Sua avaliação acrescenta informações relacionadas à progressão e ao prognóstico da doença e deve ser considerada juntamente com o estágio funcional e a pressão arterial sistêmica (IRIS, 2026; TORCHIA et al., 2024).

A pressão arterial, embora não constitua um biomarcador bioquímico, também integra a avaliação dos pacientes com DRC devido à associação entre doença renal e hipertensão sistêmica. O subestadiamento baseado na pressão arterial auxilia na estimativa do risco de lesão em órgãos-alvo e complementa a

classificação funcional fornecida pelos marcadores séricos (BARTGES, 2012; IRIS, 2026; POLZIN, 2011).

Embora tenha outros marcadores que são usados para avaliar a função renal, ureia e creatinina permanecem amplamente utilizadas na rotina laboratorial veterinária. Sua relevância clínica e sua presença em fluidos biológicos justificam o interesse na investigação de metodologias capazes de identificar e quantificar esses analitos por abordagens complementares (ALMEIDA et al., 2016; GIANSANTE et al., 2022; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROSSI et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016).

Ainda que outros biomarcadores sejam empregados na avaliação da função renal, ureia e creatinina permanecem amplamente utilizadas na rotina laboratorial. A relevância clínica desses analitos e sua presença em fluidos biológicos têm motivado a investigação de metodologias complementares capazes de identificá-los e estimar suas concentrações. Estudos utilizando espectroscopia Raman demonstraram a possibilidade de obtenção de informações quantitativas relacionadas à ureia e à creatinina tanto em amostras de urina quanto de soro sanguíneo (ALMEIDA et al., 2016; BISPO et al., 2013; GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; GIANSANTE et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016).

Nesse contexto, métodos espectroscópicos apresentam interesse por permitirem analisar alterações moleculares presentes em amostras biológicas. Entre essas abordagens, a espectroscopia Raman tem sido investigada quanto à capacidade de identificar informações relacionadas a ureia, creatinina e outras modificações metabólicas associadas ao comprometimento renal (ALMEIDA et al., 2016; DELRUE; SPEECKAERT, 2022; GULYAMOV et al., 2021; GUO et al., 2018; SAATKAMP et al., 2016).

2.7. Espectroscopia Raman aplicada à avaliação da função renal

A redução da função renal modifica a composição dos fluidos biológicos em razão das alterações nos processos de filtração, regulação e excreção. Além do aumento das concentrações de compostos nitrogenados, como ureia e creatinina, alterações no metabolismo de aminoácidos e proteínas podem ocorrer em decorrência do comprometimento renal (FÜRST, 1989; IVANOV et al., 2002; RHEE; THADHANI, 2011). Como essas modificações interferem na composição molecular

do soro, parte delas pode ser expressa no perfil espectral obtido por espectroscopia Raman (DELRUE; SPEECKAERT, 2022; GUO et al., 2018; IVANOV et al., 2002).

A utilização da espectroscopia Raman para avaliação de metabólitos relacionados à função renal já foi investigada em diferentes matrizes biológicas. Estudos realizados com urina e soro demonstraram a possibilidade de identificar informações espectrais e de correlacioná-las às concentrações a partir de métodos laboratoriais de referência (ALMEIDA et al., 2016; BISPO et al., 2013; GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; GIANSANTE et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016).

Em amostras séricas, proteínas, lipídios e diferentes metabólitos contribuem simultaneamente para a formação do espectro, podendo ocorrer sobreposição entre bandas e dificultar a atribuição de uma determinada região espectral a um único composto (BELLOCQ; LORD; MENDELSOHN, 1972; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; SPEDALIERI et al., 2023; TALARI et al., 2015). Dessa forma, na avaliação renal, a informação espectral não está necessariamente limitada a uma banda específica de ureia ou creatinina, mas pode refletir um conjunto de modificações bioquímicas associadas ao comprometimento da função dos rins (DELRUE; SPEECKAERT, 2022; GUO et al., 2018; IVANOV et al., 2002).

A complexidade dos espectros obtidos em amostras biológicas favorece o emprego de métodos multivariados para interpretação dos dados. A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica exploratória utilizada para reduzir a dimensionalidade dos dados, permitindo explorar variações e padrões presentes no conjunto espectral (JOLLIFFE; CADIMA, 2016), enquanto a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) possibilita estabelecer relações entre as informações espectrais e variáveis quantitativas, como as concentrações de analitos determinadas por métodos de referência (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). A combinação dessas abordagens tem sido empregada em estudos Raman para estimativa de ureia, creatinina e outros componentes bioquímicos que dificilmente seriam representadas pela análise isolada de uma única região do espectro (ALMEIDA et al., 2016; BISPO et al., 2013; GIANSANTE et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016).

Embora a aplicação da espectroscopia Raman em materiais biológicos tenha avançado, sua utilização na avaliação da função renal envolve desafios relacionados à variabilidade das amostras, à sobreposição de bandas e às diferenças de concentração dos componentes séricos. Em particular, a identificação isolada da

contribuição espectral da creatinina pode ser dificultada pela presença simultânea de componentes séricos mais abundantes e por bandas Raman sobrepostas (ALMEIDA et al., 2016; GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; GIANSANTE et al., 2022). Essas características reforçam a importância da análise conjunta do perfil espectral e do emprego de métodos quimiométricos capazes de utilizar múltiplas variáveis espectrais para construção de modelos analíticos (JOLLIFFE; CADIMA, 2016; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

Na medicina veterinária, a espectroscopia Raman já foi aplicada à caracterização de alterações bioquímicas em amostras provenientes de cães e gatos em diferentes condições clínicas (DORAN et al., 2022; DUARTE et al., 2010; GIUSEPPE et al., 2022; LOPES et al., 2024). Entretanto, quando direcionada à função renal, a investigação de amostras séricas dessas espécies permanece menos explorada em comparação aos estudos realizados em humanos. Nesse contexto, a caracterização do perfil espectral sérico permite investigar se alterações relacionadas à função renal produzem padrões espectrais passíveis de associação com biomarcadores convencionais, como ureia e creatinina (ALMEIDA et al., 2016; BISPO et al., 2013; DELRUE; SPEECKAERT, 2022; GIANSANTE et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade da espectroscopia Raman associada à análise quimiométrica para a quantificação dos níveis de ureia e creatinina em amostras de soro sanguíneo de cães e gatos, com e sem doença renal, contribuindo como um método alternativo de diagnóstico e monitoramento de alterações da função renal na medicina veterinária.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade da espectroscopia Raman em detectar alterações espectrais associadas às concentrações séricas de ureia e creatinina em cães e gatos.
- Aplicar a análise de componentes principais (PCA) aos espectros Raman para avaliar a variabilidade espectral e identificar possíveis padrões de agrupamento entre as amostras dos grupos Controle e Alterado de cães e gatos.
- Investigar a capacidade preditiva dos modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para a quantificação dos biomarcadores renais e determinar quais dos analitos têm maior capacidade de serem detectados pelo modelo.
- Desenvolver modelos de classificação utilizando a análise discriminante por PLS (PLS-DA) para discriminar as amostras entre os grupos controle e alterado, com base nos espectros Raman e na classificação obtida pelos exames laboratoriais convencionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este estudo seguiu as normas de conduta de experimentação animal e foi realizado após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Anhembi Morumbi (UAM), de acordo com o Parecer No. 007/2015 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, sob o Processo No. 16/2025.

4.2. Amostras biológicas

Este estudo experimental foi realizado com 89 amostras de soro sanguíneo de cães e gatos provenientes de indivíduos com e sem alterações laboratoriais nos biomarcadores renais ureia e creatinina, cedidas pelo Laboratório LEAD (São Paulo, SP, Brasil) e pelo Laboratório Foco (Osasco, SP, Brasil).

Os animais com alterações laboratoriais incluídos no estudo apresentavam alteração nos níveis de ureia e/ou creatinina, independentemente da causa, podendo ser IRA ou DRC, não havendo restrição quanto à raça, sexo ou idade dos mesmos. Na Tabela 1 estão descritos todos os animais selecionados, separados por espécie (gatos e cães), idade e respectivos valores de ureia e creatinina séricas. Foram considerados os seguintes valores como faixas de referência para os parâmetros bioquímicos avaliados: ureia entre 10 e 56 mg/dL para gatos e cães, e creatinina entre 0,6 e 1,8 mg/dL para gatos e entre 0,5 e 1,6 mg/dL para cães, de acordo com os valores de referência citados em Kaneko et al. (2008).

Foram coletados aproximadamente 2,0 mL de amostra de sangue total, acondicionados em tubo a vácuo (seco) sem anticoagulante. Todos os tubos passaram pelo processo de centrifugação para separação do soro sanguíneo. As concentrações séricas dos marcadores renais foram previamente determinadas pelos laboratórios parceiros por meio de método espectrofotométrico colorimétrico (método analítico padrão), realizado em analisador bioquímico automatizado, conforme os protocolos empregados na rotina laboratorial. Esses valores foram utilizados como referência para a classificação das amostras nos grupos

experimentais Controle (valores dos analitos dentro da faixa dos valores de referência) e Alterado (valores fora da faixa dos valores de referência).

O Grupo Controle foi composto por 41 amostras séricas, sendo 28 de cães (16 machos e 12 fêmeas) e 13 de gatos (5 machos e 8 fêmeas). Já o Grupo Alterado foi composto por 48 amostras séricas, sendo 15 de cães (6 machos e 9 fêmeas) e 33 de gatos (14 machos e 19 fêmeas). Observou-se predominância de gatos no Grupo Alterado e de cães no Grupo Controle, conforme a distribuição das amostras selecionadas para o estudo. A avaliação das alterações renais em felinos apresenta relevância clínica, considerando que a doença renal crônica constitui uma condição frequentemente descrita nessa espécie, especialmente em animais idosos (WAKI et al., 2010). Não foi realizado cálculo prévio do poder estatístico para determinação do tamanho amostral, uma vez que foram utilizadas amostras provenientes de um banco de soros previamente disponível. Entretanto, o número de amostras permitiu a construção e validação dos modelos quimiométricos empregados neste estudo.

A Figura 5A apresenta o diagrama esquemático da organização das amostras utilizadas no estudo para avaliação quantitativa de ureia e creatinina séricas pela espectroscopia Raman. A distribuição entre os sexos foi considerada proporcional, minimizando possíveis influências do dimorfismo sexual nas análises espectrais. A Figura 5B apresenta as etapas do procedimento experimental, incluindo a coleta das amostras de soro sanguíneo, o armazenamento sob congelamento (−18 °C a −20 °C), o descongelamento e preparo das amostras à temperatura ambiente, seguidas pela análise por espectroscopia Raman e processamento dos dados espectrais. Em seguida, os dados foram analisados por métodos quimiométricos, incluindo a PCA para identificação das características espectrais que diferenciam os grupos e a regressão PLS para quantificação de ureia e creatinina e classificação.

Tabela 1 – Descrição de todos os animais selecionados, separados por espécie (gatos e cães), idade e respectivos valores de ureia e creatinina séricas.

Felino				Canino			
Nome do animal	Idade	Ureia	Creatinina	Nome do animal	Idade	Ureia	Creatinina
F1	9 anos	66,6	2,13	C1	13 anos	125	1,55
F2	8 anos	47	0,83	C2	6 anos	40	0,54
F3	7 anos	61	1,57	C3	9 anos	48	0,79
F4	9 anos	88	2,15	C4	3 anos	32	0,72
F5	13 anos	48	0,82	C5	9 anos	24	0,51
F6	5 anos	244	5,19	C6	5 anos	30	0,55
F7	13 anos	125	2,28	C7	12 anos	218	3,13
F8	6 anos	94,8	2,72	C8	5 anos	42	1
F9	9 anos	90,2	1,96	C9	5 anos	32	0,88
F10	3 anos	47	0,46	C10	13 anos	175	3,41
F11	4 anos	64	1,93	C11	9 anos	36	0,69
F12	9 anos	117	2,79	C12	5 anos	36	0,92
F13	14 anos	84,1	2,51	C13	5 anos	35	1,02
F14	8 anos	117	3,7	C14	15 anos	82,55	1,59
F15	5 anos	54	1,05	C15	8 anos	313	6,73
F16	11 anos	452	7,6	C16	5 anos	37	1,04
F17	2 anos	35	0,88	C17	10 anos	45	0,54
F18	11 anos	41	1,42	C18	2 anos	14	0,51
F19	8 anos	298	8,21	C19	8 anos	454	8,72
F20	5 anos	400	4,27	C20	14 anos	21	0,45
F21	4 anos	46	0,94	C21	14 anos	56	1,11
F22	10 anos	126	1,93	C22	10 anos	37	0,72
F23	7 anos	318	9,97	C23	3 anos	36	1,59
F24	7 anos	37	1,39	C24	8 anos	30	0,82
F25	12 anos	452	15,73	C25	15 anos	431	6,68
F26	6 anos	95	2,28	C26	14 anos	375	3,39
F27	7 anos	53	1,74	C27	14 anos	166	2,64
F28	5 anos	52	1,14	C28	8 anos	41	0,62
F29	12 anos	131	3,09	C29	16 anos	571	6,12
F30	3 anos	38	0,69	C30	13 anos	208,11	4,13
F31	13 anos	263	5,62	C31	1 ano	44	0,51
F32	7 anos	172	3,11	C32	6 anos	154	1,94
F33	11 anos	56	1,34	C33	13 anos	116,12	1,25
F34	12 anos	30	0,99	C34	15 anos	35	0,49
F35	11 anos	150	1,82	C35	11 anos	28	1,15
F36	11 anos	261	4,74	C36	6 anos	91	2,32
F37	8 anos	204	3,89	C37	12 anos	246	3,58
F38	11 anos	90	2,75	C38	8 anos	22	1,08
F39	11 anos	101	2,84	C39	7 anos	34	0,67
F40	7 anos	220	3,35	C40	8 anos	49	1,34
F41	4 anos	348	3,74	C41	5 anos	55	0,53
F42	5 anos	91	1,67	C42	10 anos	68	1,16
F43	5 anos	87	3,65	C43	5 anos	40	1,2
F44	8 anos	168	4,19				
F45	6 anos	249	5,79				
F46	3 anos	563	17,61				

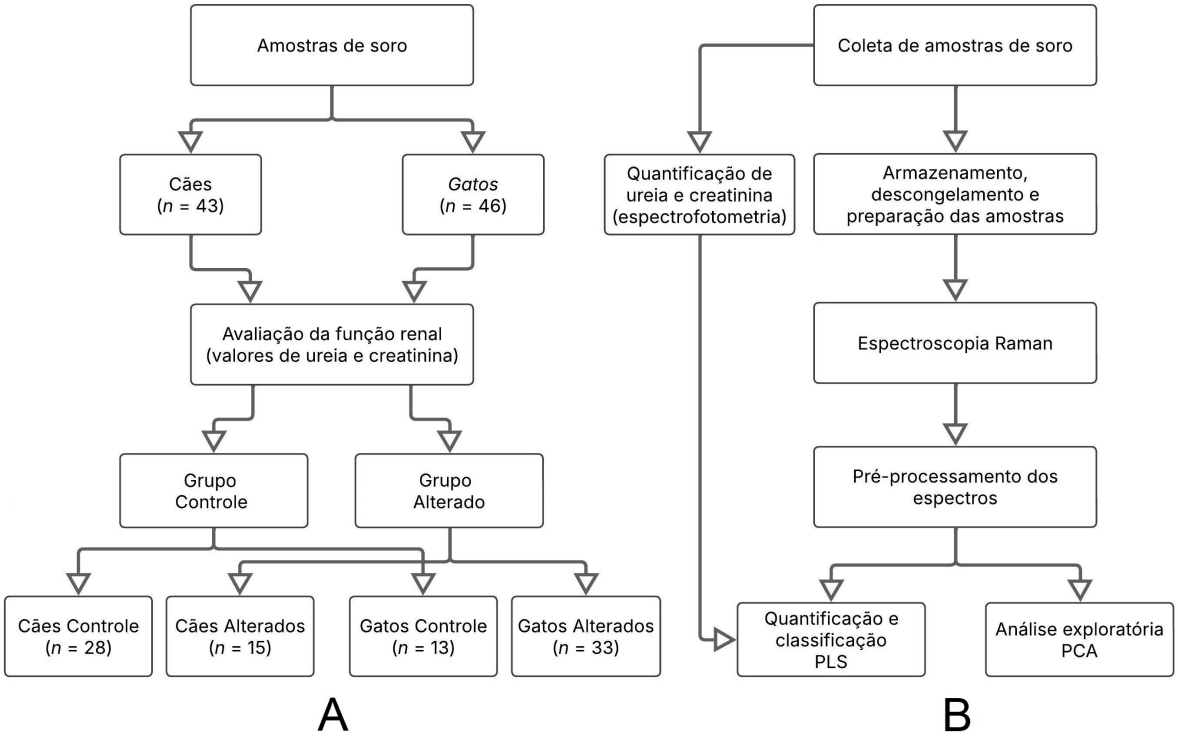


Figura 5 – Diagramas esquemáticos representando: A) a organização das amostras utilizadas no estudo para avaliação de ureia e creatinina por espectroscopia Raman e B) as etapas do procedimento experimental empregado, incluindo as etapas de coleta das amostras de soro sanguíneo (realizada pelos profissionais dos laboratórios parceiros), armazenamento sob congelamento (−18 °C a −20 °C), descongelamento à temperatura ambiente e preparo das amostras, seguido de análise por espectroscopia Raman, e processamento dos dados espectrais. Após, os dados foram analisados por métodos quimiométricos, incluindo PCA para análise exploratória e regressão PLS para quantificação de ureia e creatinina e classificação.

Os frascos com as amostras de soro foram identificados e armazenados sob congelamento em temperatura controlada entre –18°C e –20 °C por aproximadamente uma semana até o momento da análise espectral. Para obtenção dos espectros, esses frascos foram descongelados passivamente à temperatura ambiente, acondicionados em um porta amostras de alumínio polido e submetidos à espectroscopia Raman.

4.3. Aquisição dos espectros Raman

Os espectros Raman das amostras de soro foram obtidos em um espectrômetro Raman dispersivo (modelo P-1, Lambda Solutions, Inc., Waltham, MA, EUA), equipado com laser de diodo operando em 830 nm, acoplado a uma

sonda Raman (modelo Vector Probe, Lambda Solutions, Inc.), constituída por fibras ópticas e desenvolvida para aquisição espectral em geometria de retroespalhamento. A sonda conduz o feixe de excitação laser até a amostra e coleta a radiação Raman gerada pela interação inelástica entre a luz incidente e as moléculas presentes na amostra. Essa configuração permite a aquisição de espectros em pequenos volumes de soro. A potência do laser de excitação foi ajustada para 300 mW na saída da sonda Raman. O espectrógrafo possui uma grade de difração com 1200 linhas/mm acoplado a uma câmera CCD do tipo "*back-thinned, deep-depletion*" (1340×100 pixels) refrigerada por Peltier, operando a –70 °C. O conjunto espectrógrafo/CCD apresenta resolução espectral de aproximadamente 4 cm^{-1} na faixa espectral de 400 a 1800 cm^{-1}, conforme especificação técnica do equipamento.

Para a aquisição espectral, alíquotas de 90 µL de soro sanguíneo foram depositadas no porta amostras, sendo posteriormente posicionadas no ponto focal da extremidade distal da sonda Raman. A aquisição e o armazenamento dos espectros foram realizados por meio do software RamanSoft (Lambda Solutions, Inc.), que controla o tempo de exposição e o número de aquisições por amostra. Para cada amostra de soro sanguíneo, foram realizadas três leituras independentes (triplicatas), utilizando tempo de aquisição de 4 s e 10 acumulações, totalizando 40 s de tempo de integração por espectro.

Após a aquisição dos espectros, os mesmos foram submetidos a uma etapa de pré-processamento, que consistiu na remoção manual de artefatos associados a raios cósmicos utilizando o software Excel (versão 2003 Microsoft do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) e na correção da linha de base do espectro (decorrente de autofluorescência e *stray light*) utilizando o software MATLAB (versão 2014b, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Em seguida, os espectros foram normalizados pela área sob a curva e os espectros médios dos grupos Controle e Alterado foram calculados e plotados para gatos e cães, bem como a diferença entre os espectros médios (Alterado – Controle), com o objetivo de identificar diferenças relevantes nas características espectrais entre os grupos para as duas espécies.

4.4. Análise exploratória por análise de componentes principais (PCA)

A técnica estatística multivariada PCA foi empregada como análise exploratória para a identificação das principais variações presentes no conjunto de dados. A técnica PCA reduz a dimensionalidade dos dados espectrais enquanto que propicia a avaliação da variabilidade nos espectros e a identificação de padrões de comportamento intragrupos e diferenças entre os grupos (ALMEIDA et al., 2016).

Na PCA, as variáveis originais, que são as intensidades e posições dos picos Raman, são transformadas em novas variáveis ortogonais denominados componentes principais (PCs), que são combinações lineares das variáveis originais e explicam a variância total dos dados (DA SILVA et al., 2024; JOLLIFFE; CADIMA, 2016). Os PCs resultam em três variáveis de saída: os *scores*, os *loadings* e as variáveis latentes. Os *scores* correspondem à projeção das amostras no novo espaço das variâncias definido pelos PCs, permitindo identificar características espectrais, como os picos associados à ureia e a creatinina. Os *loadings* carregam as intensidades das características espectrais vistas nos *scores*, identificando variações bioquímicas específicas que ocorrem entre os grupos, além de apontar em quais grupos essas variações se tornam mais evidentes (DA SILVA et al., 2024; GIANSANTE et al., 2022). A PCA transforma as variáveis espectrais originais em componentes principais ortogonais. Os scores representam as projeções das amostras nesses componentes e permitem examinar padrões de distribuição e agrupamento. Os loadings representam os pesos das variáveis espectrais e auxiliam na identificação das regiões que contribuem para cada componente. A variância explicada por componente é calculada a partir dos respectivos autovalores. As variáveis latentes por sua vez informam a porcentagem de variância contida em cada PC. Somente os *scores* e *loadings* com a maior porcentagem de variância foram utilizados na análise exploratória dos dados. A PCA foi calculada utilizando a função princomp.m no software MATLAB.

Os *scores* foram testados utilizando o teste *t* de Student, que compara a média de dois grupos e verifica se há diferenças significativas entre os grupos. O teste *t* foi usado para avaliar diferenças estatisticamente significativas referente aos valores dos *scores* obtidos pela PCA do grupo Controle comparativamente ao grupo Alterado. O teste *t* foi precedido do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, que verificou se a distribuição dos dados obedeceu à distribuição normal (BUANA;

ADNAN, 2025). Nos casos em que a distribuição não seja normal, foi empregado o teste Mann-Whitney (teste *t* não paramétrico). O nível de significância considerado foi 5% ($p < 0,05$). O teste *t* de Student ou Mann-Whitney foi aplicado usando o software Graphpad Instat (versão 3.0, Graphpad Sofftware Inc., San Diego, CA USA, www.graphpad.com).

4.5. Análise quantitativa por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A regressão PLS é também uma técnica multivariada que foi empregada para modelar as variáveis espectrais que possuem correlação com as concentrações medidas de ureia e creatinina pela técnica analítica padrão, e assim desenvolver modelos quantitativos preditivos para determinar as concentrações destes analitos em amostras prospectivas (amostras de teste) (ALMEIDA et al., 2016; GUO et al., 2018), bem como realizar a classificação dos espectros em dois grupos: Controle e Alterado empregando a análise discriminante por PLS (PLS-DA).

O modelo utilizou a validação cruzada do tipo “deixa-um-espectro-de-fora” (“*leave-one-spectrum-out cross-validation*” – LOSOcv), que consiste na retirada de um espectro do conjunto para teste, enquanto o modelo é construído com os demais espectros, e o espectro retirado é usado para testar o modelo. O espectro retirado é então reintegrado ao conjunto de dados, um novo espectro é retirado e o modelo é novamente construído. O novo espectro retirado é então testado. Esse processo é repetido até que cada um dos espectros seja retirado, o modelo seja construído e o espectro deixado de fora seja testado. O desempenho do modelo de regressão PLS foi avaliado por meio do coeficiente de correlação de Pearson (*r*) e do erro quadrático médio (RMSE), parâmetros estes obtidos a partir das amostras de teste da validação cruzada LOSOcv. Estes parâmetros foram estimados a partir do número de variáveis latentes (LV) considerado ótimo para o modelo, que resultaram no maior *r* e menor RMSE para cada analito em cada espécie (DA SILVA et al., 2024; HANLON et al., 2000). A regressão por PLS foi realizada utilizando o software Chemoface (versão 1.64, Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil, http://ufla.br/chemoface).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Espectros Raman dos soros de gatos e cães

O soro constitui-se como uma matriz complexa que revela o estado metabólico sistêmico de um indivíduo, contendo, além de água, proteínas (principalmente albumina e globulinas), aminoácidos, lipídios (principalmente triglicerídeos e colesterol), carboidratos (principalmente glicose), íons inorgânicos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, bicarbonato e fosfato), subprodutos nitrogenados (ureia, creatinina, ácido úrico e amônia), minerais e outros compostos orgânicos e inorgânicos. Desta forma, o espectro Raman do soro é também complexo e apresenta sobreposição de picos de diversos compostos. Como a albumina sérica é a proteína mais abundante no soro, compreendendo cerca de 60% da massa proteica total (KANEKO et al., 2008), bandas proteicas dominam o espectro.

A Figura 6 apresenta os espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro de gatos (Figura 6.A, 46 amostras, 136 espectros) e de cães (Figura 6.B, 43 amostras, 126 espectros), ambos separados nos grupos Controle (valores de referência) e Alterado (valores acima da referência). A Figura 6 também mostra a diferença entre os espectros dos dois grupos para ambas as espécies. Os picos observados nos espectros médios do soro estão associados a proteínas (principalmente albumina), lipídios (principalmente triglicerídeos) e metabólitos nitrogenados (principalmente ureia). Os espectros das duas espécies assemelham-se entre si, sugerindo composição semelhante, e assemelham-se ao espectro Raman do soro humano (GIANA et al., 2025; GIANSANTE et al., 2022). A Tabela 2 resume a atribuição dos picos vistos nos espectros médios e da diferença.

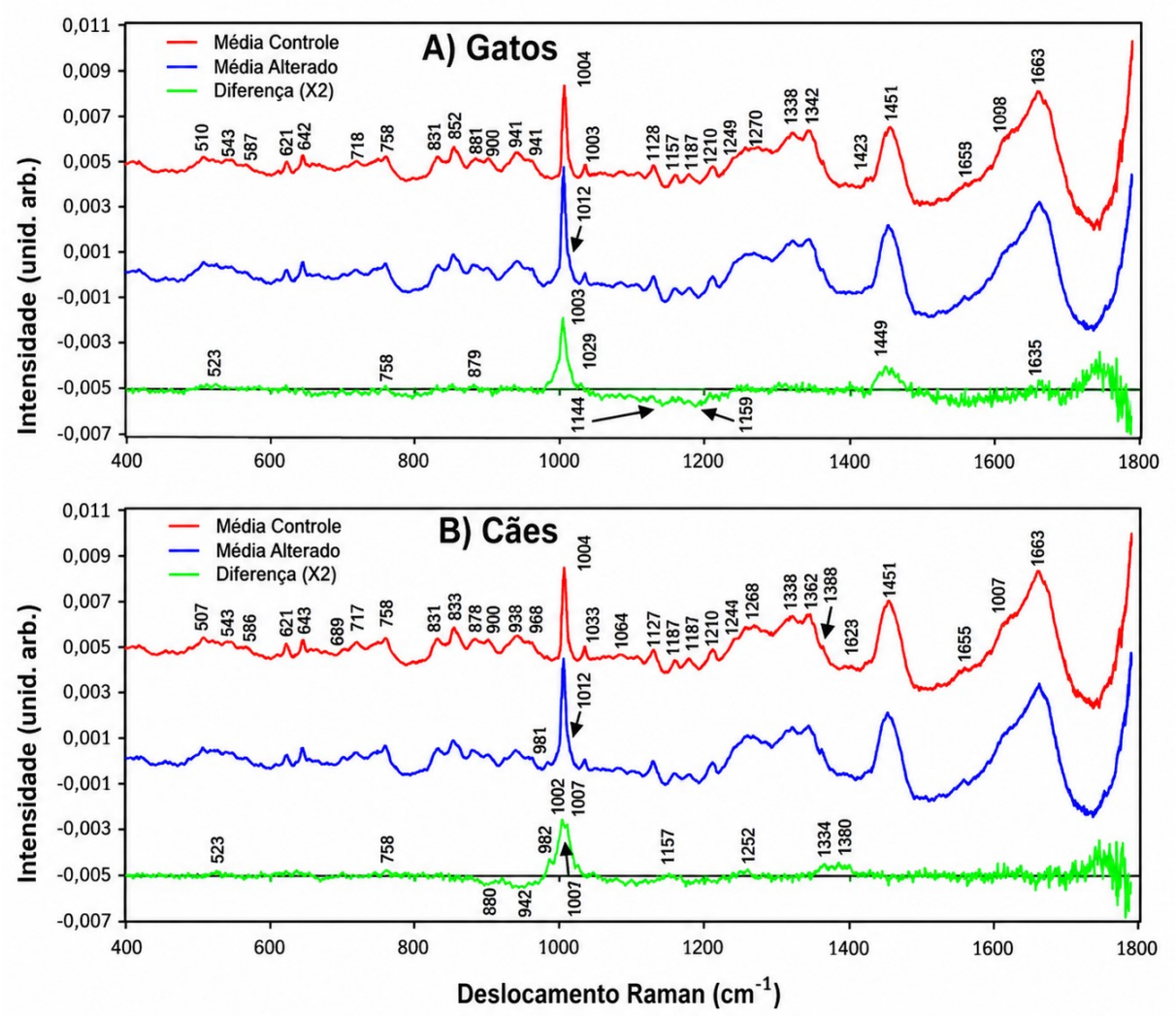


Figura 6 – Espectros Raman médios e normalizados das amostras de soro de: (A) gatos e (B) cães dos grupos Controle e Alterado. A diferença entre os espectros médios (Alterado – Controle) para cada espécie também é mostrada. Os espectros foram deslocados verticalmente e a diferença foi multiplicada por 2 para melhorar a visualização.

Os espectros Raman do soro na região de 400-1800 cm^{-1} possuem picos associados a proteínas séricas, principalmente albumina e globulinas, além de contribuições importantes de aminoácidos das proteínas quanto livres, e picos de lipídios. Entre as bandas mais características das proteínas destacam-se as bandas em 510–545 cm^{-1}, atribuídos à cisteína (S–S), pico estreito em 1004 cm^{-1}, atribuído ao modo de respiração do anel aromático da fenilalanina, as bandas em 1230–1270 cm^{-1}, associadas à amida III, e as bandas em 1655–1665 cm^{-1}, correspondentes à amida I, ambas relacionadas principalmente às conformações das estruturas secundárias proteicas, especialmente α–hélice e β–folha. As vibrações em 1440–1455 cm^{-1} são atribuídas à deformação de grupos metileno e metil (CH_2 e CH_3)

presentes tanto em proteínas quanto em lipídios séricos, não sendo um marcador específico. Aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano, presentes nas proteínas séricas e também na forma livre, contribuem para determinadas regiões espectrais, especialmente em ~830–850 cm^{-1} (dubleto da tirosina), 758, 1012 e 1555 cm^{-1} (triptofano), além das bandas próximas de 620 e 640 cm^{-1}, atribuídas à fenilalanina e à tirosina, respectivamente (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007). A presença desses componentes no soro está relacionada ao metabolismo proteico e à circulação de aminoácidos provenientes da digestão e absorção intestinal. Particularmente, o triptofano é um aminoácido essencial que circula predominantemente ligado à albumina e participa da síntese proteica e de vias metabólicas relacionadas à produção de serotonina e quinurenina. Seu metabolismo também é influenciado pela microbiota intestinal e por processos inflamatórios, podendo sofrer alterações em condições de desequilíbrio intestinal (GAO et al., 2020). Assim, a presença de bandas associadas a esses aminoácidos nos espectros Raman é compatível com a composição bioquímica do soro sanguíneo, não sendo possível atribuir essas bandas exclusivamente a alterações metabólicas decorrentes da disfunção renal. Apesar de sobrepostos aos picos proteicos, os lipídios séricos podem contribuir com o espectro observado, com uma banda importante em ~1080 cm^{-1}, relacionada ao estiramento C–C de cadeias alifáticas, além da banda em ~1260–1270 cm^{-1}, atribuída a modos de deformação =C–H e sobreposta à banda de amida III, e em ~1650–1660 cm^{-1}, atribuída às vibrações de estiramento de ligações C=C de lipídios insaturados. Adicionalmente, picos em ~1300 cm^{-1} e ~1445 cm^{-1} são associados aos modos de deformação (*twisting*/*wagging* e *scissoring*, respectivamente) de grupos CH_2, presentes em ácidos graxos, refletindo a contribuição espectral dos lipídios séricos.

Na plotagem da diferença entre os espectros médios da Figura 6, foram observadas características espectrais positivas que são associadas a diferentes componentes bioquímicos, como proteínas e aminoácidos, íons fosfato e sulfato, e principalmente metabólitos nitrogenados (AGUIAR et al., 2013; BELLOCQ; LORD; MENDELSOHN, 1972; DELRUE; SPEECKAERT, 2022; ESMONDE-WHITE et al., 2009; GIANSANTE et al., 2022; GOULART et al., 2022; GUALERZI et al., 2017; GUO et al., 2024; KAMRAN et al., 2024; LIN et al., 2023; MELITTO et al., 2022; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; SPEDALIERI et al., 2023; TALARI et al., 2015), maiores nos grupos Alterado. De modo geral, há uma semelhança nos picos

principalmente na região de ~1002/1003 cm^{-1}, mais intensos nos grupos Alterado, atribuídos principalmente às vibrações da ureia e em menor extensão do anel aromático da fenilalanina para ambas as espécies, e especialmente nos cães, indicando acúmulo de metabólitos urêmicos associadas à disfunção renal. Alguns picos positivos apresentaram posições semelhantes entre cães e gatos, enquanto outros picos positivos apresentaram posições distintas, sugerindo particularidades metabólicas e bioquímicas entre as espécies frente à disfunção renal. Entre as bandas mais relevantes, o pico em 523/526 cm^{-1} está relacionado às vibrações da ligação dissulfeto (S–S) da cisteína, frequentemente associadas a modificações conformacionais proteicas, enquanto que o pico em 758 cm^{-1} (anel indol do triptofano) também sugere mudança na conformação da albumina, em ambas as espécies. Essas alterações podem refletir modificações estruturais induzidas pelo estado urêmico, estresse oxidativo e desequilíbrio metabólico observados em pacientes com doença renal (IVANOV et al., 2002). Para os gatos (Figura 6.A), os picos mais relevantes na diferença incluem os picos positivos em 879, 1029, 1449 e 1665 cm^{-1}, atribuídos a proteínas, lipídios e amida I (estrutura secundária proteica). O aumento dessas bandas nos animais do grupo Alterado sugere mudanças conformacionais e possíveis alterações na composição proteica sérica decorrentes da disfunção renal. Foram observados picos negativos em 1144 e 1189 cm^{-1} (maiores no grupo Controle), podendo estar relacionados a vibrações de componentes proteicos, incluindo modos de estiramento C−C e C−N e grupos associados a tirosina/fenilalanina respectivamente. No espectro da diferença para os cães (Figura 6.B), os picos positivos em 982, 1004, 1157, 1252, 1364 e 1380 cm^{-1} podem estar associados a íons fosfato e sulfato (?) (982 cm^{-1}), que compostos frequentemente aumentados em alterações renais devido ao comprometimento da excreção, a picos proteicos e de aminoácidos aromáticos (1004, 1157, 1252 e 1364 cm^{-1}) e ácido úrico (?) (1380 cm^{-1}). Os picos negativos em 899, 942 e 1004 cm^{-1} podem não ter significado relevante.

Os picos positivos associados à ureia (1002–1007 cm^{-1}), observados com maior intensidade nos animais com alteração renal nas duas espécies, indicam acúmulo de compostos nitrogenados no soro de ambas as espécies, caracterizando um achado compatível com disfunção renal aguda ou crônica (FÜRST, 1989; RHEE; THADHANI, 2011). Os picos de fosfato (982 cm^{-1}), observados nos cães com alteração renal, também indicam a diminuição da excreção de compostos urêmicos,

compatível com a lesão renal nestes animais. Como na doença renal ocorre a incapacidade dos rins em realizar a filtração adequada, o acúmulo de metabólitos nitrogenados e íons fosfato e sulfato no sangue pode levar a alterações no metabolismo proteico, sugerindo que o ambiente bioquímico gerado pela disfunção renal favorece alterações estruturais e funcionais em proteínas séricas (BELLOCQ; LORD; MENDELSOHN, 1972), podendo contribuir para modificações conformacionais detectáveis por técnicas espectroscópicas.

Tabela 2 – Atribuições dos picos Raman da Figura 6 (espectros médios e diferença entre os espectros) e das Figuras 7 e 8 (*loadings* da PCA) tendo como base os espectros da literatura para espectros Raman de proteínas e lipídios (AGUIAR et al., 2013; BELLOCQ; LORD; MENDELSOHN, 1972; ESMONDE-WHITE et al., 2009; FÜRST, 1989; GUALERZI et al., 2017; GUO et al., 2024; MELITTO et al., 2022; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; SPEDALIERI et al., 2023; TALARI et al., 2015), soro humano (DELRUE; SPEECKAERT, 2022; GIANSANTE et al., 2022; GOULART et al., 2022; KAMRAN et al., 2024; SPEDALIERI et al., 2023) e soro de cães (LOPES et al., 2024).

Pico Raman – espectro médio (cm^{-1})	Pico Raman – espectro da diferença* e *loading* da PCA**	Atribuição principal	Biomoléculas / observações
507/510	505 (PC2), 508 (PC4)	Estiramento S–S – ponte dissulfeto (conformação g–g–g)	
	523/526*	Estiramento S–S – ponte dissulfeto (conformação g–g–t); deformação C–C–O – anel piranose (glicose)	Resíduo de cisteína – albumina (estabilidade estrutural); pequena contribuição da glicose
543		Estiramento S–S – ponte dissulfeto (conformação t–g–t)	
565/567		Ponte S–S (?)	Cisteína (?)
621	621 (PC2), 634 (PC4)	Deformação do anel aromático; deformação do anel purínico (?)	Fenilalanina; ácido úrico (?)
642/643	643 (PC2), 645 (PC3)	Deformação do anel fenólico; estiramento C–S; deformação esquelética/respiração do anel – creatinina (?)	Tirosina; cisteína; creatinina (?)
699	700 (PC3)	Deformação do anel esterólico	Colesterol
717/718		Estiramento C–S – metionina (?)	Metionina (?)
758	758*, 758 (PC2), 758/761 (PC3)	Triptofano – respiração do anel indólico	Marcador de triptofano em proteínas

Pico Raman – espectro médio (cm^{-1})	Pico Raman – espectro da diferença* e *loading* da PCA**	Atribuição principal	Biomoléculas / observações
831	829 (PC3), 811 (PC4)	Tirosina (dubleto); estiramento C–N – creatinina (?)	Proteínas séricas – albumina (sensível a pontes de hidrogênio); creatinina (?)
852/853	854 (PC2)		
878/881	879*, 881 (PC3), 892 (PC4)	Triptofano – C–H (anel); fosfato (PO_4^{3-}); deformação =C–H – lipídios	Proteínas; íon fosfato; lipídios (insaturados) (pequena contribuição)
900		Estiramento C–C (esquelético) (?) – proteínas	Proteínas
939/941	937 (PC2), 941 (PC4)	Esqueleto C–C – proteínas; prolina/valina (?)	Proteínas; aminoácidos (?)
958/961		Proteínas	Proteínas (albumina)
981	982*, 982 (PC3), 982 (PC4)	Íon fosfato (PO_4^{3-})	Síntese de ATP
1004	1002/1003/1007*, 1002/1003 (PC2), 1004 (PC3), 1000 (PC4), 1004 (PC4)	Fenilalanina – respiração do anel; estiramento C–N – ureia	Proteínas e aminoácidos livres; ureia (sobreposição importante)
1033	1029*, 1030 (PC2), 1032 (PC4)	Fenilalanina – flexão C–H e estiramento C–C – anel aromático; estiramentos C–N e C–O – ácido úrico (?)	Proteínas; ácido úrico (?)
1012		Respiração do anel aromático	Triptofano
1084		Estiramento C–C – cadeia alifática	Lipídios (insaturados) – pequena contribuição
	1096 (PC3)	Fosfato (PO_4^{3-})	Íon fosfato
1127/1128	1126 (PC2)	Estiramentos C–N e C–C – proteínas; estiramentos C–OH e C–C – glicose	Proteínas; pequena contribuição da glicose em indivíduos diabéticos
1157	1157*, 1161 (PC3), 1151 (PC4)	Modos do anel aromático (?) – aminoácidos	Proteínas (aminoácidos com anéis aromáticos)
1176	1165 (PC3)		
1210	1208 (PC2), 1213 (PC4)	Estiramento C–C e deformação (flexão) C–H em $C–C_6H_5$ – modos do anel aromático	Proteínas: fenilalanina e tirosina
1241/1246	1252*, 1246 (PC3), 1248 (PC3), 1254 (PC4)	Amida III – β–folha	Proteínas

Pico Raman – espectro médio (cm^{-1})	Pico Raman – espectro da diferença* e *loading* da PCA**	Atribuição principal	Biomoléculas / observações
1268/1270		Amida III – estrutura aleatória; deformação =C–H – lipídios	Proteínas; lipídios (insaturados)
(1300–1305)		Torção/oscilação de CH_2	Lipídios (sobrepostos pela banda larga de amida III)
1318	1316 (PC2)	Amida III – α–hélice	Cadeias laterais proteicas
1342	1338/1340 (PC2)	Modos de deformação CH_2/CH_3 (sobreposição com amida III) (?)	Proteínas
1358	1364*	Modos do anel indólico	Triptofano
1393	1380*, 1376/1383 (PC4)	Estiramento C=N; deformações do anel	Ácido úrico (?)
1423		Estiramento C=N; deformações do anel	Ácido úrico (?)
(1440–1450	1436 (PC3)	Modos de deformação CH_2/CH_3	Proteínas; lipídios (incluindo colesterol)
1451	1449*, 1449/1450 (PC2), 1451/1453 (PC4)	Flexão/deformação CH_2/CH_3, tesoura e oscilação	Proteínas e lipídios (incluindo colesterol)
1555/1556		Estiramentos C=C e C=N – anel indólico	Triptofano
1607/1608	1613 (PC4)	Estiramento C=C – anel aromático; estiramentos C=N e C=C – ácido úrico (?)	Fenilalanina, tirosina; ácido úrico (?)
1656/1658	1665*, 1659/1662 (PC2)	Amida I – α–hélice; estiramento C=C – lipídios	Proteínas; lipídios insaturados (incluindo colesterol)

5.2. Análise exploratória por PCA

Os espectros dos soros foram submetidos à análise exploratória por PCA e as triplicatas dos espectros foram consideradas como medidas individuais para a PCA. As variáveis da PCA: *loadings* (características espectrais) e valores médios dos *scores* (intensidades) foram plotadas para gatos e cães nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Os valores de variância para os PCs 1 a 6 dos espectros dos gatos foram de 91.6%, 4.1%, 0.7%, 0.3%, 0.2% e 0.2%, respectivamente, e os valores para os espectros dos cães foram de 90.0%, 4.2%, 0.7%, 0.6%, 0.3% e 0.3%,

respectivamente. As atribuições dos picos seguem a Tabela 2 (AGUIAR et al., 2013; BELLOCQ; LORD; MENDELSOHN, 1972; DELRUE; SPEECKAERT, 2022; ESMONDE-WHITE et al., 2009; FÜRST, 1989; GIANSANTE et al., 2022; GOULART et al., 2022; GUALERZI et al., 2017; GUO et al., 2024; KAMRAN et al., 2024; LOPES et al., 2024; MELITTO et al., 2022; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; NOTINGHER, 2007; SPEDALIERI et al., 2023; TALARI et al., 2015).

De maneira geral, observou-se semelhança no padrão dos *loadings* obtidos para cães e gatos, principalmente nos primeiros componentes principais, com contribuições localizadas em regiões espectrais próximas nas duas espécies. A correspondência entre os perfis sugere que constituintes bioquímicos semelhantes contribuíram para a variabilidade espectral, embora diferenças na intensidade e na participação relativa de determinadas bandas tenham sido observadas.

As características espectrais negativas observadas no *Loading*1 dos gatos e cães refletem as características espectrais encontradas no espectro médio do soro de cada espécie (Figura 6), característico de composto com elevada concentração proteica, com picos principalmente da albumina e das globulinas, e contribuição de lipídios séricos. Não houve diferença estatisticamente significativa no *Score*1 entre os grupos Controle e Alterado (teste Mann-Whitney, p = 0,08 para gatos e p = 0,20 para cães), sugerindo que a matriz proteica básica é semelhante nos grupos. O *Loading*1/*Score*1 apresentou característica negativa; valores negativos são matematicamente válidos na PCA e refletem apenas a orientação arbitrária do autovetor correspondente ao componente principal, não implicando diferença física intrínseca nos dados.

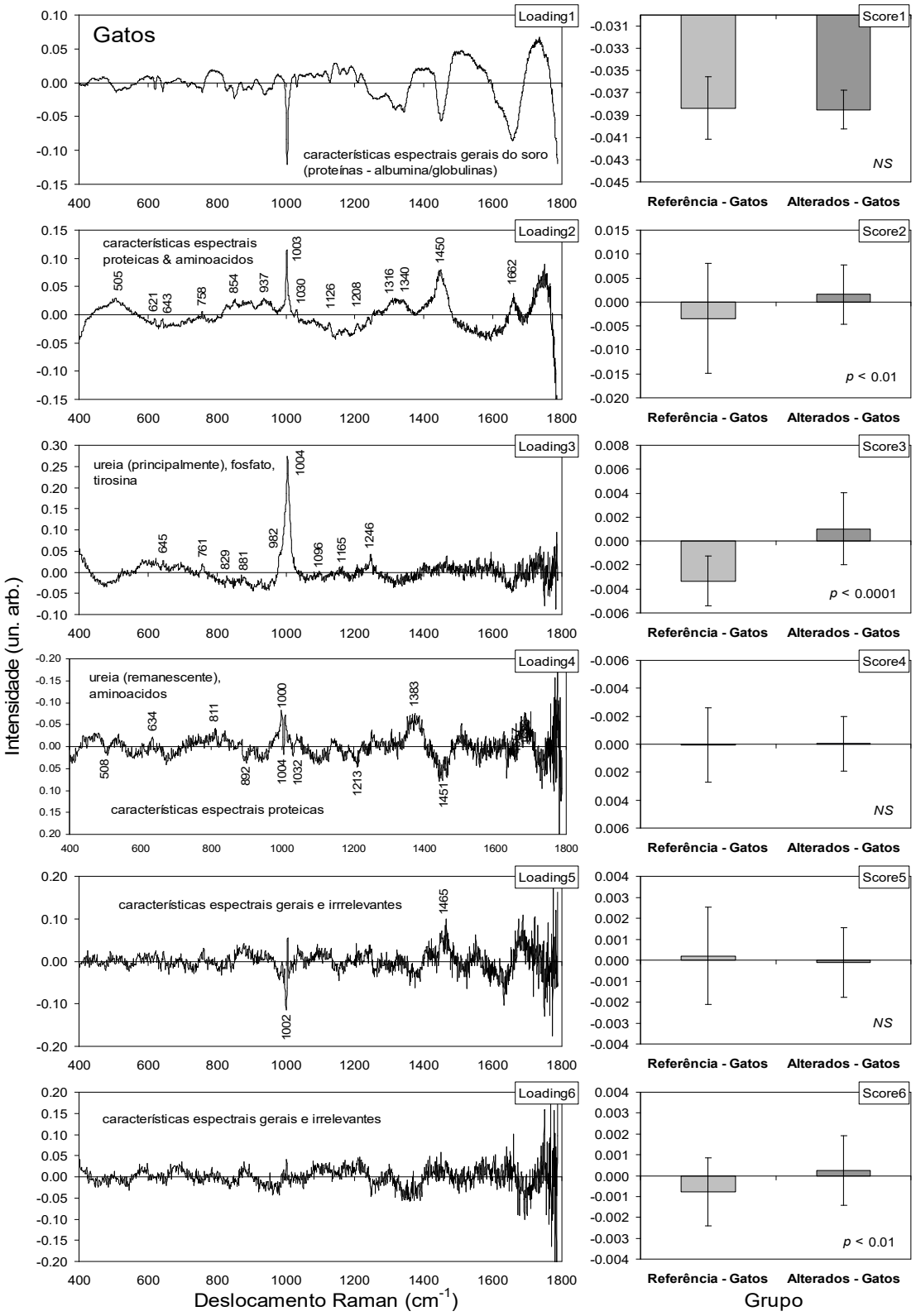


Figura 7 – Plotagem das variáveis da PCA: *loadings* (características espectrais) e *scores* (intensidades) calculadas para os espectros dos gatos. Valores médios dos *scores* dos grupos Controle e Alterado também foram calculados e plotados. Os valores do *Loading*4 e *Score*4 tiveram o eixo vertical invertido para comparação com os mesmos *loadings* e *scores* dos cães. Os resultados do teste de significância (teste Mann-Whitney, valor de *p*) são indicados nos *scores*. *NS* – estatisticamente não significativo.

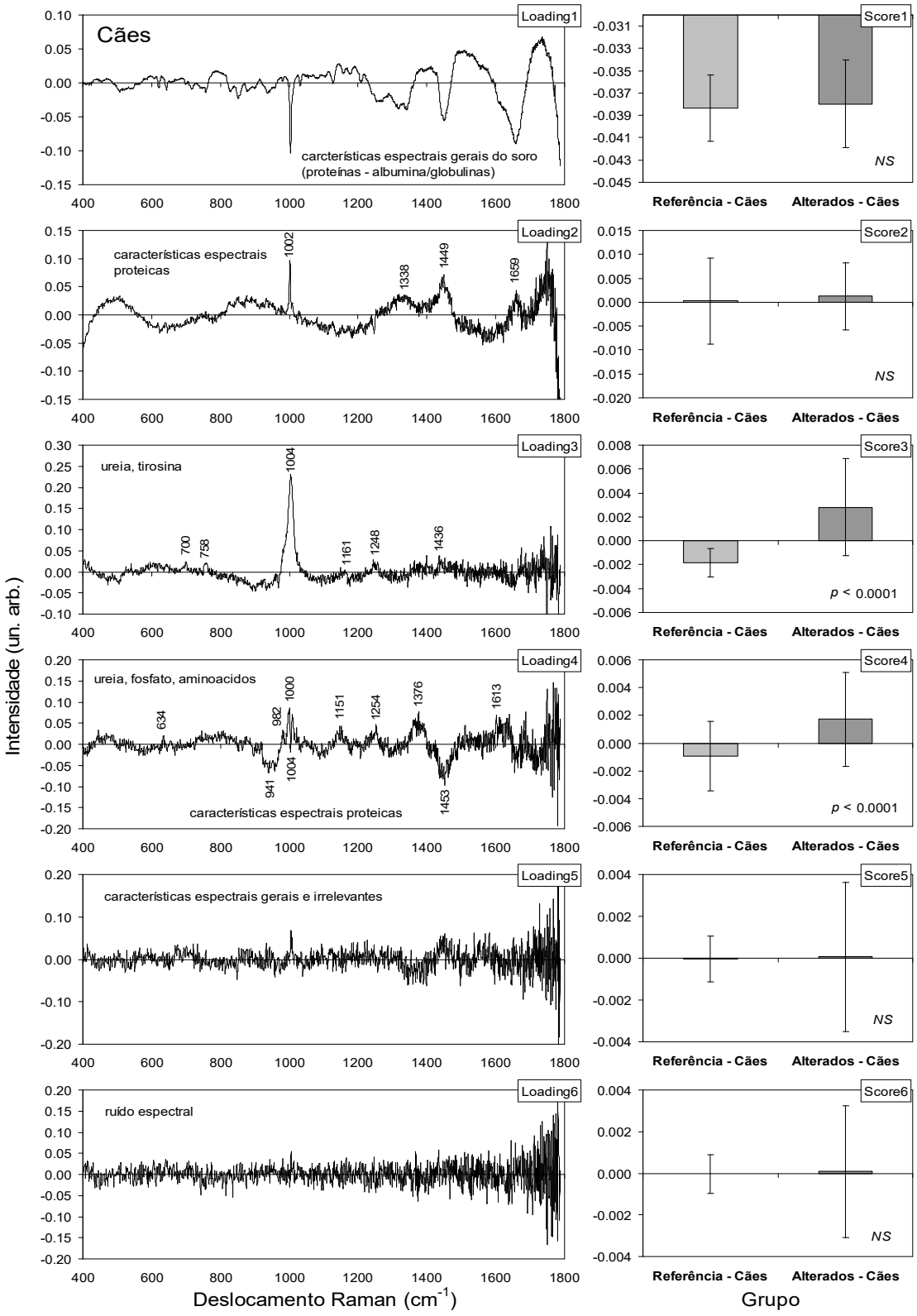


Figura 8 – Plotagem das variáveis da PCA: *loadings* (características espectrais) e *scores* (intensidades) calculadas para os espectros dos cães. Valores médios dos *scores* dos grupos Controle e Alterado também foram calculados e plotados. Os resultados do teste de significância (teste Mann-Whitney, valor de *p*) são indicados nos *scores*. *NS* – estatisticamente não significativo.

Para o *Loading*2, as características espectrais revelaram picos positivos 1002/1003, 1338/1340, 1449/1450 e 1659/1662 cm^{-1}, comuns a gatos e cães e que são atribuídos a proteínas do soro e aminoácidos (tanto nas proteínas quanto livres), e picos positivos em 505, 621, 643, 758, 854, 937, 1030, 1126, 1208 e 1316 cm^{-1} para gatos, e que podem ser atribuídos na quase totalidade a proteínas e aminoácidos. O *Score*2 apresentou diferença estatisticamente significativa para gatos (teste Mann-Whitney, $p < 0,01$), porém não apresentou diferença estatisticamente significativa para cães (teste Mann-Whitney, $p = 0,40$), e ambos tiveram maior intensidade para o grupo Alterado. A maior intensidade, mesmo que não significativa para cães, sugere que os animais com alteração renal possuem maior teor de proteínas e aminoácidos séricos e/ou alterações na conformação proteica da albumina ou do ambiente químico. Essas alterações compatíveis com a fisiopatologia da doença renal, caracterizada pela diminuição da filtração glomerular, retenção de ureia e de outros compostos nitrogenados, bem como alterações no metabolismo proteico (BELLOCQ; LORD; MENDELSOHN, 1972; FÜRST, 1989). Esse ambiente bioquímico pode favorecer modificações estruturais e funcionais de proteínas séricas, as quais podem ser identificadas por técnicas espectroscópicas devido às alterações nas vibrações moleculares associadas às ligações peptídicas e aos aminoácidos aromáticos. Assim, as diferenças espectrais relacionadas a proteínas e aminoácidos podem refletir alterações metabólicas e estruturais associadas ao estado urêmico decorrente da disfunção renal (FÜRST, 1989; IVANOV et al., 2002).

O *Loading*3 revelou características espectrais positivas que são atribuídas a compostos nitrogenados, principalmente ureia (picos em 1004 e 1161/1165 cm^{-1}) para ambas as espécies, creatinina (?) (picos em 645 e 829 cm^{-1}) e picos atribuídos a proteínas/aminoácidos (triptofano – 758/761 e amida III – 1246/1248 cm^{-1}) para os gatos. Picos atribuídos ao íon fosfato (PO_4^{3-}) podem ser encontrados em 881, 982 e 1096 cm^{-1} para os gatos. O *Score*3 mostrou que essas características foram significativamente maiores para o grupo Alterado (teste Mann-Whitney, $p < 0,0001$ para gatos e cães), significando que houve aumento na concentração de ureia para os cães e ureia e fosfato para os gatos no grupo Alterado, além de uma sugestiva alteração conformacional ou do microambiente das proteínas séricas para os gatos.

O *Loading*4 apresentou picos positivos e negativos, sendo o pico em 1000 cm^{-1} atribuído a ureia, em ambas as espécies, e picos de fosfato (982 cm^{-1}),

proteínas/aminoácidos (634, 1151 e 1254 cm^{-1}). Entretanto, apesar da semelhança entre algumas características espectrais, o comportamento dos *scores*4 diferiu entre cães e gatos, com diferença significativa entre os grupos apenas nos cães (teste Mann-Whitney, $p < 0,0001$). A contribuição do fosfato pode estar associada às alterações do metabolismo decorrentes da redução da função renal, que compromete sua excreção e favorece sua retenção. Contudo, como a espectroscopia Raman identifica a assinatura vibracional global da matriz sérica, incluindo diferentes compostos que contêm grupos fosfato. Esse achado pode refletir alterações na composição bioquímica do soro associadas à disfunção renal, mas não deve ser interpretado isoladamente como evidência de hiperfosfatemia, cuja confirmação requer a determinação da concentração sérica de fósforo inorgânico. Picos sugestivos de ácido úrico (?) (1376 e 1613 cm^{-1}) para cães, e picos que podem ser devido a aminoácidos (634 cm^{-1}), e que também podem ser devido à presença de ácido úrico (?) (811 e 1383 cm^{-1}) em gatos, enquanto que os picos negativos podem ser atribuídos principalmente a proteínas e aminoácidos (508, 892, 1004, 1032, 1213 e 1451 cm^{-1} para gatos e 941, 1004 e 1453 cm^{-1} para cães), refletindo variações na composição proteica do soro em função da espécie. O *Score*4 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Alterado para os gatos (teste Mann-Whitney, $p = 0,40$), porém apresentou valores significativamente maiores no grupo Alterado para os cães (teste Mann-Whitney, $p < 0,0001$). Esse resultado sugere que, nos cães avaliados, as diferenças entre os grupos estão associadas a alterações na composição bioquímica do soro, envolvendo regiões espectrais atribuídas a metabólitos urêmicos, grupos fosfato e constituintes proteicos. Nos gatos, contribuições espectrais semelhantes foram observadas no *Loading*3/*Score*3, indicando que essas alterações podem ser representadas por diferentes componentes principais em cada espécie. Entretanto, essas contribuições não permitem afirmar diretamente maior concentração dos compostos associados às bandas nem estabelecer o grau de comprometimento renal dos animais, uma vez que a PCA evidencia padrões de variabilidade espectral, sem determinar isoladamente a concentração dos metabólitos ou a gravidade clínica da disfunção renal.

Os *Loading*5 e *Loading*6 dos espectros dos gatos apresentaram picos, porém com bastante ruído espectral. O *Score*5 não apresentou diferença estatisticamente significativa para ambas espécies (teste Mann-Whitney, $p = 0,13$

para gatos e p = 0,91 para cães), e o *Score*6 apresentou diferença estatisticamente significativa apenas para gatos (teste Mann-Whitney, $p < 0,01$ para gatos e p = 0,28 para cães), sugerindo que estas características espectrais podem estar relacionadas com variações individuais e não são importantes para o entendimento das diferenças entre os grupos. Para os cães, estes mesmos *loadings* apresentaram apenas ruído e os respectivos *scores* não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

5.3. Modelo de regressão PLS

Os espectros das amostras de soro de gatos e cães foram modelados pela regressão por PLS com o objetivo de investigar a capacidade da técnica de espectroscopia Raman em avaliar quantitativamente os biomarcadores ureia e creatinina, ambos associados à avaliação da função renal. No modelo PLS, os espectros Raman são as variáveis independentes, enquanto que as concentrações dos analitos obtidas por análise colorimétrica (técnica analítica padrão) são as variáveis dependentes.

A Figura 9.A apresenta as plotagens dos valores das concentrações reais e concentrações preditas pelo modelo PLS aplicado aos espectros Raman para os analitos ureia e creatinina dos gatos, bem como os valores de r e RMSE para o número de LV que forneceu o maior r e o menor RMSE para cada analito sob validação cruzada LOSOcv (LV = 5 para os dois analitos e as duas espécies) (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Já a Figura 9.B apresenta as plotagens dos mesmos gráficos para o modelo PLS aplicado aos espectros dos cães. Embora o LOSOcv permita a validação interna do modelo, a presença de espectros da mesma amostra no treinamento e na validação, associada à seleção das variáveis latentes, pode superestimar seu desempenho. Para minimizar essas limitações, recomenda-se a validação por animal e com amostras independentes.

Na Figura 9.A1, os resultados obtidos para a quantificação de ureia sérica em gatos demonstraram um elevado grau de correlação entre os valores reais e os valores previstos pela regressão PLS, apresentando r = 0,94 (muito forte) e RMSE = 43 mg/dL. Embora alto, este valor de RMSE deve ser interpretado considerando a ampla faixa de concentrações presente nas amostras analisadas, com valores máximos em 451 mg/dL. Na Figura 9.B1, a quantificação por PLS de ureia sérica em

cães apresentou *r* = 0,98 (muito forte) e RMSE = 27 mg/dL, resultados superiores aos obtidos para os gatos. Para o analito creatinina sérica, o modelo PLS apresentou desempenho ligeiramente inferior, porém muito satisfatório. Para os gatos (Figura 9.A2), o modelo apresentou *r* = 0,89 (também muito forte) e RMSE = 1,6 mg/dL, evidenciando uma alta correlação e boa capacidade de predição dentro da faixa típica de concentração desse biomarcador, uma vez que os valores mais altos foram de 17,61 mg/dL. A creatinina sérica em cães (Figura 9.B2) apresentou regressão PLS com valores de *r* = 0,93 (muito forte) e RMSE = 0,72 mg/dL. A distribuição dos pontos em torno da linha de regressão diagonal indicou um desempenho consistente do modelo ao longo da faixa de concentrações avaliadas.

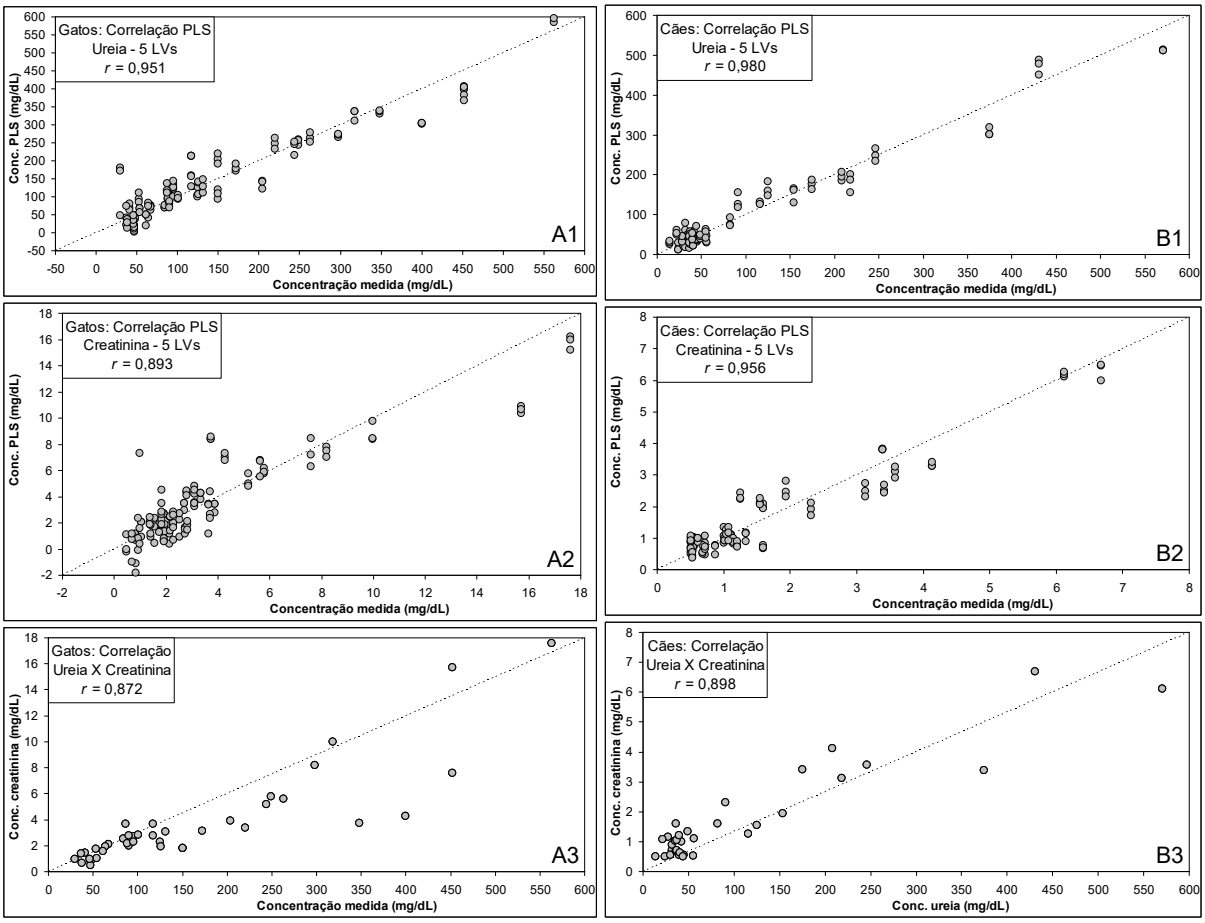


Figura 9 – Plotagem dos valores das concentrações reais, obtidas pelo método analítico padrão (colorimetria), versus as concentrações de ureia e creatinina obtidas pelo modelo de regressão PLS aplicada aos espectros de soro de cães e gatos. A1) Ureia em gatos, A2) creatinina em gatos, A3) concentrações reais de ureia versus creatinina em gatos. B1) Ureia em cães, B2) creatinina em cães, B3) concentrações reais de ureia versus creatinina em cães. Os valores dos parâmetros de desempenho da regressão PLS: *r* e RMSE também são apresentados, com o número de LVs no qual esses valores foram obtidos.

As Figuras 9.A3 e 9.B3 também apresentam a correlação entre as concentrações séricas de ureia e creatinina, evidenciando uma correlação positiva e muito forte entre esses dois biomarcadores, com *r* = 0,88 para gatos e *r* = 0,91 para os cães. Essa associação é esperada, uma vez que ambos os analitos estão diretamente relacionados ao metabolismo nitrogenado e são amplamente utilizados como indicadores da função renal (GALVÃO et al., 2010).

Como esperado, o modelo PLS desenvolvido a partir dos espectros do soro dos gatos e cães demonstrou alta correlação entre os valores preditos pelo modelo e os valores obtidos pela técnica colorimétrica, tanto para ureia quanto creatinina. Os modelos desenvolvidos para a estimativa da ureia apresentaram coeficientes de correlação ligeiramente superiores aos da creatinina, evidenciando maior capacidade preditiva de detecção deste composto nitrogenado no soro pela técnica Raman. Essa diferença pode estar relacionada principalmente às características químicas e às concentrações típicas de ureia no soro sanguíneo. A maior concentração de ureia no soro sanguíneo quando comparada à creatinina aumenta sua contribuição relativa para o sinal espectral, favorecendo a construção de modelos estatísticos com maior capacidade de correlação. A creatinina está normalmente presente em concentrações menores no soro sanguíneo, o que reduz sua contribuição para o sinal espectral. Em fluidos biológicos, como o soro, o espectro é predominantemente influenciado por proteínas, que tendem a dominar a assinatura espectral da amostra. Como consequência, as bandas vibracionais associadas à creatinina apresentam baixa intensidade relativa e podem se sobrepor às bandas das proteínas. Essa sobreposição dificulta a distinção direta das suas contribuições espectrais, influenciando o desempenho do modelo preditivo, o que pode explicar o desempenho ligeiramente inferior observado em comparação com a ureia (KAMRAN et al., 2024).

Os modelos obtidos para cães apresentaram desempenho ligeiramente superior, já que os coeficientes de correlação foram mais elevados e os valores de RMSE foram menores, quando comparados aos resultados observados para gatos. Essa diferença pode estar associada a fatores como a melhor distribuição das concentrações dos analitos ao longo da faixa de concentrações nas amostras avaliadas, variações na composição bioquímica do soro entre as espécies, e possíveis diferenças na contribuição espectral dos metabólitos em relação aos componentes predominantes da matriz sérica. Ainda assim, os resultados obtidos

para ambas as espécies demonstraram forte correlação entre os valores previstos pelos espectros Raman e aqueles obtidos por métodos bioquímicos de referência, confirmando a presença de informações espectrais relevantes relacionadas à ureia e à creatinina (DA SILVA et al., 2024; KAMRAN et al., 2024; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

A dispersão observada nos gráficos de regressão PLS reflete diferenças entre os valores preditos e medidos, podendo estar associada à variabilidade biológica, à complexidade da matriz sérica e às limitações do modelo em capturar variáveis espectrais exclusivas dos analitos de interesse dada possíveis sobreposições de picos destes analitos com os da matriz sérica (principalmente picos da albumina e das globulinas). A sobreposição mais evidente é a do pico mais intenso da ureia com o pico de proteínas (fenilalanina) em torno de 1004 cm^{-1}, devido à proximidade de suas frequências vibracionais nessa região espectral. A fenilalanina, presente na composição das proteínas séricas, apresenta uma banda Raman característica associada à vibração do anel aromático, enquanto a ureia, produto do metabolismo nitrogenado hepático e eliminada predominantemente pelos rins, pode apresentar concentrações elevadas em animais com comprometimento da função renal. Dessa forma, a sobreposição decorre principalmente das características vibracionais dessas moléculas, dificultando a atribuição desse sinal exclusivamente à ureia. Mesmo assim, a correlação entre os valores reais e preditos foi muito forte. Já a correlação das concentrações reais e preditas de creatinina pode ter se beneficiado da alta correlação entre este e a ureia, onde as variáveis espectrais deste analito são modeladas juntamente com as variáveis da creatinina.

Os achados deste trabalho correlacionam-se com os obtidos em avaliação de ureia e creatinina sérica em amostras de soro humano com espectroscopia Raman empregando o mesmo espectrômetro e metodologia PLS equivalente. No estudo de Giansante et al. (2022) e Giana et al. (2025) as concentrações analíticas de ureia e creatinina foram obtidas em soro humano e correlacionadas com os espectros Raman utilizando modelo de regressão PLS, semelhante ao empregado neste estudo. Giansante et al. (2022) avaliaram pela espectroscopia Raman alguns analitos, dentre eles ureia e creatinina, e com base na regressão PLS aplicada aos espectros, obtiveram r = 0,89 e 0,64, e RMSEcv = 4,9 e 0,21 mg/dL, respectivamente. No estudo de Giana et al. (2025), os melhores resultados preditivos para ureia e creatinina foram obtidos com o espectrômetro de bancada,

associado à aplicação do filtro Savitzky-Golay para redução de ruído, apresentando valores de *r* = 0,89 e RMSEcv = 10,3 mg/dL para ureia, e *r* = 0,86 e RMSEcv = 0,70 mg/dL para creatinina. Almeida et al. (2016) propuseram um modelo de quantificação PLS para os mesmos analitos séricos, obtendo valores de *r* = 0,97 e RMSEcv = 17,6 mg/dL para ureia e *r* = 0,93 e RMSEcv = 1,94 mg/dL para creatinina. Saatkamp et al. (2016) analisaram ureia e creatinina na urina e obtiveram valores de *r* = 0,90 e 0,91 e RMSEcv = 312,0 e 25,2 mg/dL, respectivamente.

As diferenças entre os coeficientes de correlação *r* observados nos estudos citados e os obtidos no presente trabalho podem estar relacionadas às características dos conjuntos amostrais (animais de estimação *versus* humanos) e às condições metodológicas empregadas. As diferenças nas espécies, a distribuição das concentrações dos analitos, a variabilidade biológica, a composição da matriz analisada, assim como a calibração e estabilidade do equipamento, a sobreposição das bandas espectrais e os procedimentos empregados na construção dos modelos, podem influenciar o desempenho da regressão PLS (ALMEIDA et al., 2016; GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; GIANSANTE et al., 2022). Além disso, diferenças no processamento dos espectros e nas características da matriz analisada devem ser consideradas na comparação entre os estudos, especialmente quando são avaliados diferentes fluidos biológicos, como soro e urina (ALMEIDA et al., 2016; GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; SAATKAMP et al., 2016). Dessa forma, os elevados coeficientes obtidos no presente estudo indicam forte associação entre as informações espectrais e as concentrações determinadas pelo método de referência nas amostras avaliadas, não devendo ser interpretados, isoladamente, como evidência de desempenho superior da espectroscopia Raman em cães e gatos em relação aos estudos realizados em humanos (ALMEIDA et al., 2016; GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; GIANSANTE et al., 2022; SAATKAMP et al., 2016).

Entre os analitos avaliados, a creatinina tende a apresentar maior dificuldade para estimativa espectral devido à sua menor concentração no soro e à sobreposição de suas bandas com sinais provenientes de componentes predominantes da matriz, especialmente proteínas (GIANA; SOUZA; SILVEIRA, 2025; GIANSANTE et al., 2022).

5.4. Classificação dos espectros: em função da espécie e da alteração renal

O modelo de regressão PLS foi aplicado para a classificação (PLS-DA) das amostras de acordo com a espécie (Gato ou Cão) e de acordo com a presença ou não de alteração renal pelo exame laboratorial (Controle e Alterado). Para tal, o conjunto de espectros foi considerado como variável independente e o grupo ao qual cada espectro pertence foi considerado como variável dependente. A Tabela 3 apresenta as matrizes de confusão para essas duas classificações. Valores de acurácia de classificação foram próximos de 94% para todas as classificações. Este resultado sugere que as características espectrais que definem as espécies estão presentes no soro, independente dos animais apresentarem alterações renais, o que pode ser confirmado pelo estudo de McLaughlin et al. (2014), que obtiveram diferenciação do sangue de diferentes espécies de animais e humanos. Este resultado sugere que as alterações espectrais do soro tanto devido à espécie quanto devido à presença de alterações renais são detectadas pelo espectro Raman e podem ser usadas como classificação e diagnóstico.

Tabela 3 – Tabela de confusão com os resultados da classificação dos espectros por regressão PLS (PLS-DA) em função da presença ou não de alteração renal (Controle e Alterado) para cada espécie e classificação por espécie (Gato e Cão).

Classificação real	Classificação obtida pelo modelo PLS			
Classificação baseada nos valores do método colorimétrico	Gatos		Cães	
	Controle	Alterado	Controle	Alterado
Controle (*n* = 34 gatos, *n* = 78 cães)	30	4	78	0
Alterado (*n* = 102 gatos, *n* = 48 cães)	5	97	7	41
Acurácia	93,4 %		94,4 %	
Classificação por espécie	Espécie			
	Gato		Cão	
Gatos (*n* = 136)	130		6	
Cães (*n* = 126)	11		115	
Acurácia	93,5 %			

5.5. Perspectivas futuras e aplicações clínicas na medicina veterinária

A literatura tem apresentado pesquisas com o uso da espectroscopia Raman em diagnóstico na medicina veterinária (DORAN et al., 2022; DUARTE et al., 2010; GIUSEPPE et al., 2022; LOPES et al., 2024; MCLAUGHLIN; DOTY; LEDNEV, 2014). Duarte et al. (2010) empregaram a espectroscopia Raman como método para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de gatos, utilizando a regressão PLS como ferramenta de classificação. Em 59 amostras avaliadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), os espectros revelaram variações associadas à presença de anticorpos IgG. O modelo de classificação PLS apresentou alta sensibilidade (100%) e boa acurácia (90%) de diagnóstico, indicando que a técnica é promissora como alternativa rápida, não invasiva e de menor custo para o diagnóstico da toxoplasmose. Acri et al. (2022) avaliaram a aplicação da espectroscopia Raman como método diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum* em cães utilizando a análise do soro sanguíneo. Em 22 animais avaliados (infectados e controles), os resultados evidenciaram alterações espectrais relevantes nos animais infectados, relacionadas principalmente à leucina e ao metabolismo lipídico, possivelmente ligadas à interação parasita-hospedeiro. Os autores destacaram a necessidade de estudos com maior número de animais e maior investigação sobre a especificidade das alterações observadas. Lopes et al. (2024) avaliaram a espectroscopia Raman como ferramenta para diferenciar cães saudáveis de cães com câncer a partir do espectro do soro sanguíneo, utilizando PCA para identificar a alteração espectral e regressão PLS para discriminação. O modelo apresentou desempenho satisfatório na classificação, com acurácia de 78%, sensibilidade de 76% e especificidade de 81%, demonstrando que a espectroscopia Raman apresenta potencial como ferramenta para triagem e apoio diagnóstico complementar na oncologia veterinária. A técnica Raman também foi explorada em diagnóstico de câncer em procedimentos intraoperatórios experimentais. Doran et al. (2022) avaliaram a utilização da espectroscopia Raman portátil como ferramenta intraoperatória para diferenciar tecido cerebral normal de neoplasias intracranianas em cães. Em 11 animais analisados com diferentes tipos de tumores, e as leituras espectrais realizadas diretamente no tecido durante o procedimento cirúrgico, foi demonstrada boa capacidade de diferenciação tecidual, com acurácia de 87,5%, sensibilidade de 85,7% e especificidade de 90%. Os resultados indicam que a

espectroscopia Raman pode atuar como um recurso auxiliar, contribuindo para maior precisão na ressecção tumoral.

A aplicação da técnica Raman em amostras de soro permite a detecção de alterações moleculares de forma rápida, não destrutiva e com alta sensibilidade, demonstrando ser uma abordagem eficaz frente às limitações dos métodos bioquímicos convencionais. Os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial da espectroscopia Raman como ferramenta complementar para a avaliação de biomarcadores renais na medicina veterinária. Entre as principais perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de aumentar o número de animais avaliados em cada espécie, e o emprego de espectrômetros Raman portáteis programados para coleta e processamento dos espectros em ambientes clínicos. Essa possibilidade irá ampliar o seu uso em pronto atendimento, favorecendo a obtenção mais rápida de informações relevantes durante a consulta clínica ou no acompanhamento de animais hospitalizados. Além disso, a urina também se apresenta como uma matriz promissora, especialmente por também possibilitar monitoramento de alterações renais (BISPO et al., 2013; SAATKAMP et al., 2016).

A integração da espectroscopia Raman com ferramentas quimiométricas também representa uma perspectiva relevante para a consolidação da técnica na rotina clínica. O desenvolvimento de modelos automatizados e com uso de redes neurais artificiais ou mesmo inteligência artificial poderá contribuir para a interpretação mais rápida e padronizada dos espectros, podendo favorecer a identificação de padrões associados à disfunção em diferentes espécies, raças, idades e condições fisiopatológicas.

6. CONCLUSÃO

A espectroscopia Raman, combinada com métodos de análise multivariada PCA e regressão PLS, foi capaz de identificar as diferenças espectrais no soro de animais com e sem alterações renais e estimar a concentração dos biomarcadores renais, ureia e creatinina, em amostras de soro de gatos e cães.

A diferença entre os espectros dos grupos Controle e Alterado mostrou maiores concentrações de metabólitos nitrogenados, especialmente ureia, além de proteínas/aminoácidos nos grupos Alterado das duas espécies, e íons fosfato nos cães. A aplicação da PCA permitiu identificar padrões mais complexos da composição bioquímica nos espectros dos grupos, com a identificação de picos referentes aos analitos ureia e fosfato (intensos nas duas espécies), picos estes aumentados nas amostras do grupo Alterado, além do aumento na intensidade de picos de proteínas e aminoácidos séricos também no grupo Alterado, sugerindo modificações na composição ou conformação proteicas associadas à disfunção renal.

Os modelos de regressão PLS possibilitaram estabelecer relações quantitativas entre os dados espectrais e as concentrações laboratoriais de ureia e creatinina, com correlações muito fortes (r > 0,90) para a ureia em ambas as espécies e creatinina em cães, e forte (r > 0,85) para creatinina em gatos. A classificação dos espectros de acordo com a presença de alteração renal (Controle e Alterado) e com a espécie (gato e cão) resultou em acurácia entre 93% e 95%. Os altos coeficientes de correlação observados, aliados aos valores relativamente baixos de erro de validação cruzada, indicam que os espectros Raman contêm informações relevantes associadas à presença de metabólitos relacionados à disfunção renal (compostos nitrogenados e proteínas/aminoácidos) no soro sanguíneo, e podem ser empregados em diagnóstico laboratorial.

A identificação de bandas espectrais características desses compostos contribui para o avanço no diagnóstico precoce de disfunções renais, como a doença renal crônica (DRC) e a insuficiência renal aguda (IRA). Esses achados reforçam o potencial da técnica Raman como ferramenta complementar para análises bioquímicas e laboratoriais, com possibilidade de utilização em abordagens diagnósticas, contribuindo para o desenvolvimento de métodos analíticos e

minimamente invasivos, possibilitando um acompanhamento clínico mais preciso, beneficiando a saúde e o bem-estar dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRI, G.; FALCONE, A.; GIANNETTO, C.; GIUDICE, E.; PICCIONE, G.; TESTAGROSSA, B.; CICERO, L.; CASSATA, G.; DI PIETRO, S. Preliminary study for the application of Raman spectroscopy for the identification of Leishmania infected dogs. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, art. 7489, 2022.

AGUIAR, R. P.; SILVEIRA, L.; FALCÃO, E. T.; PACHECO, M. T.; ZÂNGARO, R. A.; PASQUALUCCI, C. A. Discriminating neoplastic and normal brain tissues in vitro through Raman spectroscopy: a principal components analysis classification model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 12, p. 595-604, 2013.

ALMEIDA, M. L.; SAATKAMP, C. J.; FERNANDES, A. B.; PINHEIRO, A. L.; SILVEIRA, L. Estimating the concentration of urea and creatinine in the human serum of normal and dialysis patients through Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 7, p. 1415-1423, 2016.

AUNER, G. W.; KOYA, S. K.; HUANG, C.; BROADBENT, B.; TREXLER, M.; AUNER, Z.; ELIAS, A.; MEHNE, K. C.; BRUSATORI, M. A. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 4, p. 691-717, 2018.

BARTGES, J. W. Chronic kidney disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 669-692, 2012.

BELLOCQ, A. M.; LORD, R. C.; MENDELSOHN, R. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. 3. Native bovine serum albumin and beta-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 257, n. 2, p. 280-287, 1972.

BISPO, J. A.; DE SOUSA VIEIRA, E. E.; SILVEIRA, L.; FERNANDES, A. B. Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, n. 8, 087004, 2013. *Erratum* em: **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 5, 059801, 2016.

BROWN, C. A.; ELLIOTT, J.; SCHMIEDT, C. W.; BROWN, S. A. Chronic kidney disease in aged cats: clinical features, morphology, and proposed pathogeneses. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 2, p. 309-326, 2016.

BUANA, T. I. W.; ADNAN, A. Evaluating statistical power in t-test and Welch's test via Monte Carlo simulation approach. **Journal of Mathematics, Computations and Statistics**, v. 8, n. 2, p. 530-537, 2025.

BUTLER, H. J.; ASHTON, L.; BIRD, B.; CINQUE, G.; CURTIS, K.; DORNEY, J.; ESMONDE-WHITE, K.; FULLWOOD, N. J.; GARDNER, B.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; WALSH, M. J.; MCAINSH, M. R.; STONE, N.; MARTIN, F. L. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 664-687, 2016.

CORREIA, N. A.; BATISTA, L. T. A.; NASCIMENTO, R. J. M.; CANGUSSÚ, M. C. T.; CRUGEIRA, P. J. L.; SOARES, L. G. P.; SILVEIRA, L.; PINHEIRO, A. L. B. Detection of prostate cancer by Raman spectroscopy: a multivariate study on patients with normal and altered PSA values. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, 111801, 2020.

DA SILVA, C. R.; CARVALHO, H. C.; LAZO OSÓRIO, R. A.; FERNANDES, A. B.; SILVEIRA, L. Differences in whole blood before and after hemodialysis session of subjects with chronic kidney disease measured by Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 39, n. 1, 175, 2024.

DELRUE, C.; SPEECKAERT, M. M. The potential applications of Raman spectroscopy in kidney diseases. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 10, 1644, 2022.

DORAN, C. E.; FRANK, C. B.; MCGRATH, S.; PACKER, R. A. Use of handheld Raman spectroscopy for intraoperative differentiation of normal brain tissue from intracranial neoplasms in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 819200, 2022.

DUARTE, J.; PACHECO, M. T.; VILLAVERDE, A. B.; MACHADO, R. Z.; ZANGARO, R. A.; SILVEIRA, L. Near-infrared Raman spectroscopy to detect anti-Toxoplasma gondii antibody in blood sera of domestic cats: quantitative analysis based on partial least-squares multivariate statistics. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 4, 047002, 2010.

ESMONDE-WHITE, K. A.; MANDAIR, G. S.; RAAII, F.; JACOBSON, J. A.; MILLER, B. S.; URQUHART, A. G.; ROESSLER, B. J.; MORRIS, M. D. Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 3, 034013, 2009.

FÜRST, P. Amino acid metabolism in uremia. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 310-323, 1989.

GALVÃO, A. L. B.; BORGES, J. C.; VIEIRA, M. C.; FERREIRA, G.; LÉGA, E.; PINTO, M. Clinical and laboratory alterations of dogs and cats with chronic kidney disease: revision of literature. **Nucleus Animalium**, v. 2, n. 1, p. 23-39, 2010.

GAO, K.; MU, C.-L.; FARZI, A.; ZHU, W.-Y. Tryptophan metabolism: a link between the gut microbiota and brain. Advances in Nutrition, v. 11, n. 3, p. 709–723, 2020. DOI: 10.1093/advances/nmz127.

GIANA, H. E.; SOUZA, L. O.; SILVEIRA, L. Comparison of different Raman spectrometer models in the quantification of blood serum analytes. **Lasers in Medical Science**, v. 40, n. 1, 143, 2025.

GIANSANTE, S.; GIANA, H. E.; FERNANDES, A. B.; SILVEIRA, L. Analytical performance of Raman spectroscopy in assaying biochemical components in human serum. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 1, p. 287-298, 2022.

GOULART, A. C. C.; SILVEIRA, L.; CARVALHO, H. C.; DORTA, C. B.; PACHECO, M. T. T.; ZÂNGARO, R. A. Diagnosing COVID-19 in human serum using Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 4, p. 2217-2226, 2022.

GUALERZI, A.; NIADA, S.; GIANNASI, C.; PICCIOLINI, S.; MORASSO, C.; VANNA, R.; ROSSELLA, V.; MASSERINI, M.; BEDONI, M.; CICERI, F.; BERNARDO, M. E.; BRINI, A. T.; GRAMATICA, F. Raman spectroscopy uncovers biochemical tissue-related features of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9820, 2017.

GUO, J.; RONG, Z.; LI, Y.; WANG, S.; ZHANG, W.; XIAO, R. Diagnosis of chronic kidney diseases based on surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. **Laser Physics**, v. 28, n. 7, p. 075603, 2018.

GUO, Z.; MA, M.; LU, S.; MA, Y.; YU, Y.; GUO, Q. Applications of Raman spectroscopy in ocular biofluid detection. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, p. 1407754, 2024.

GULYAMOV, S.; SHAMSHIDDINOVA, M.; BAE, W.-H.; PARK, Y. C.; KIM, H. J.; CHO, W.-B.; LEE, Y.-M. Identification of biomarkers on kidney failure by Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 52, n. 10, p. 1712-1721, 2021.

HANLON, E. B.; MANOHARAN, R.; KOO, T. W.; SHAFER, K. E.; MOTZ, J. T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J. R.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine & Biology**, v. 45, n. 2, p. R1-R59, 2000.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). Overview of the IRIS Staging for CKD. International Renal Interest Society, 2026. Disponível em: https://www.iris-kidney.com/iris-staging-system. Acesso em: 26/08/2026.

IVANOV, A. I.; KOROLENKO, E. A.; KOROLIK, E. V.; FIRSOV, S. P.; ZHBANKOV, R. G.; MARCHEWKA, M. K.; RATAJCZAK, H. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 408, n. 1, p. 69-77, 2002.

JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2014. p. 1364-1409.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 2016.

KAMRAN, A.; NAMAN, A.; MAJEED, M. I.; NAWAZ, H.; ALWADIE, N.; HUDA, N. U.; HABIBA, U. E.; TABUSSAM, T.; BANO, A.; HAJAB, H.; RAZAQ, R.; ASHRAF, A.; AZIZ, S.; ASGHAR, M.; IMRAN, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for characterization of filtrates of blood serum samples from patients with tuberculosis obtained by 50 kDa filtration devices. **RSC Advances**, v. 14, n. 12, p. 8548-8555, 2024.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 485-528.

KARN-ORACHAI, K.; NGAMAROONCHOTE, A. Role of polyelectrolyte multilayers over gold film for selective creatinine detection using Raman spectroscopy. **Applied Surface Science**, v. 546, p. 149092, 2021.

KLEIN, B. G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p.1160-1245.

KÖNIG, Horst Erich; LIEBICH, Hans-Georg. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 411-425.

KOSTER, H. J.; GUILLEN-PEREZ, A.; GOMEZ-DIAZ, J. S.; NAVAS-MORENO, M.; BIRKELAND, A. C.; CARNEY, R. P. Fused Raman spectroscopic analysis of blood and saliva delivers high accuracy for head and neck cancer diagnostics. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18464, 2022.

LIN, R.; PENG, B.; LI, L.; HE, X.; YAN, H.; TIAN, C.; LUO, H.; YIN, G. Application of serum Raman spectroscopy combined with classification model for rapid breast cancer screening. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1258436, 2023.

LOPES, D. F.; SILVERIO, A.; SCHMIDT, A. K. A.; PICCA, G. B.; SILVEIRA, L. Characterization of biomarkers in blood serum for cancer diagnosis in dogs using Raman spectroscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 17, n. 3, p. e202300338, 2024.

MCLAUGHLIN, G.; DOTY, K. C.; LEDNEV, I. K. Raman spectroscopy of blood for species identification. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11628-11633, 2014.

MCLELAND, S. M.; CIANCIolo, R. E.; DUNCAN, C. G.; QUIMBY, J. M. A comparison of biochemical and histopathologic staging in cats with chronic kidney disease. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 3, p. 524-534, 2015.

MELITTO, A. S.; ARIAS, V. E. A.; SHIDA, J. Y.; GEBRIM, L. H.; SILVEIRA, L. Jr. Diagnosing molecular subtypes of breast cancer by means of Raman spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 54, n. 8, p. 1143-1156, 2022.

MOREIRA, L. P.; SILVEIRA, L.; PACHECO, M. T. T.; DA SILVA, A. G.; ROCCO, D. D. F. M. Detecting urine metabolites related to training performance in swimming athletes by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, p. 223-234, 2018.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews, v. 42, n. 5, p. 493-541, 2007.

NOTINGHER, I. Raman spectroscopy cell-based biosensors. **Sensors**, v. 7, n. 8, p. 1343-1358, 2007.

O'NEILL, D. G.; ELLIOTT, J.; CHURCH, D. B.; MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; BRODBELT, D. C. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: prevalence, risk factors, and survival. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 814-821, 2013.

ORTIZ-DOSAL, A.; LOREDO-GARCÍA, E.; ÁLVAREZ-CONTRERAS, A. G.; NÚÑEZ-LEYVA, J. M.; ORTIZ-DOSAL, L. C.; KOLOSOVAS-MACHUCA, E. S. Determination of the immunoglobulin G spectrum by surface-enhanced Raman spectroscopy using quasispherical gold nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2021, p. 1-6, 2021.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 41, n. 1, p. 15-30, 2011.

REECE, William O. (ed.). **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p.153-160.

RHEE, E. P.; THADHANI, R. New insights into uremia-induced alterations in metabolic pathways. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 20, n. 6, p. 593-598, 2011.

ROSSI, I. M.; LEITE, J. M.; SANTOS, L. O.; SIMÕES, A. L.; CISI, V. L. Doença renal crônica em pequenos animais e biomarcadores que visem sua precocidade. **PubVet**, v. 16, n. 11, p. 1-9, 2022.

SAATKAMP, C. J.; DE ALMEIDA, M. L.; BISPO, J. A.; PINHEIRO, A. L.; FERNANDES, A. B.; SILVEIRA, L. Quantifying creatinine and urea in human

urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 3, p. 037001, 2016.

SANTOS, L. C. S.; SILVEIRA, L.; PACHECO, M. T. T. Raman spectroscopic analysis of urinary creatine and phosphate in athletes: pre- and post-training assessment. **Journal of Biophotonics**, v. 18, n. 1, p. e202400210, 2025.

SPEDALIERI, C.; PLAICKNER, J.; SPEISER, E.; ESSER, N.; KNEIPP, J. Ultraviolet resonance Raman spectra of serum albumins. **Applied Spectroscopy**, v. 77, n. 9, p. 1044-1052, 2023.

TALARI, A. C. S.; MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 1, p. 46-111, 2015.

TORCHIA, B.; FRAGA, H. A. R.; CASTRO, L. T. S.; MINEIRO, F. S.; FIORAVANTI, M. C. S. Estadiamento da doença renal crônica em cães. **PubVet**, v. 18, n. 7, p. e1630, 2024.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2226-2234, 2010.

WANG, W.; ZHAO, J.; SHORT, M.; ZENG, H. Real-time in vivo cancer diagnosis using Raman spectroscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 7, p. 527-545, 2015.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.

ZHANG, J.; FAN, Y.; SONG, Y.; XU, J. Accuracy of Raman spectroscopy for differentiating skin cancer from normal tissue. **Medicine**, v. 97, n. 34, p. e12022, 2018.

ANEXO I

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

Processo: 16/2025

IDENTIFICAÇÃO:

Nome do(a) pesquisador(a): Andrea Vania Constantino Marangoni

Nome do(s) orientador(es): Marcos Tadeu Tavares Pacheco, Landulfo Silveira Junior

Título do Projeto: ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA À AVALIAÇÃO DE UREIA E CREATININA EM SORO SANGUÍNEO DE CÃES E GATOS PORTADORES DE DOENÇA RENAL AGUDA E CRÔNICA

Instituição(es) envolvida(s) na realização do projeto: Universidade Anhembi Morumbi – Campus São José dos Campos.

PENDÊNCIAS

1) Solicitar documento formal dos laboratórios doadores, informando que todos os exames foram realizados e o material não será mais necessário, não havendo prejuízo ao paciente, e declarando a cessão das amostras.

AVALIAÇÃO FINAL sobre todos os itens:

[ ] APROVADO.

[X] APROVADO COM RESTRIÇÕES.

[ ] REPROVADO.

Senhor pesquisador, caso haja qualquer evento adverso, favor informar este comitê em até 24h.

São Paulo, 07 de dezembro de 2025

Profa. Paula Spinha de T. Domingues

Coordenadora CEUA UAM Mooca

ANEXO II

FOCO Laboratório

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA

Declaramos, para os devidos fins, que as amostras de soro sanguíneo de cães e gatos cedidas por este laboratório foram devidamente utilizadas para a realização de exames necessários, não havendo qualquer prejuízo ao paciente.
As referidas amostras, já sem necessidade de uso por parte deste laboratório, foram e cedidas para utilização no projeto de Mestrado Espectroscopia Raman aplicada à avaliação de ureia e creatinina em soro sanguíneo de cães e gatos portadores de doença renal aguda e crônica, de responsabilidade da pesquisadora Andrea Vania Constantino Marangoni.

Alessandra Benedicta Rocca Vieira
CRMV-SP 27785
Foco Laboratório

Rua Manoel Saraiva, 118. Vila Campesina - Osasco/SP